

Die molekulare Rolle von Fibronektin im Auge und in der Niere



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Silke Anna Maria Seibold, geb. Eggerstorfer
aus Freyung

im Jahr 2019

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:
15.Mai 2019

Die Arbeit wurde angeleitet von:
Prof. Dr. Ernst R. Tamm

Unterschrift:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Fibronectin.....	6
1.1.1 Struktur	6
1.1.2 Interaktionspartner	7
1.1.3 Fibronectin und die extrazelluläre Matrix.....	8
1.1.4 Fibronectin und die Embryogenese.....	9
1.2 Die Rolle von Fibronectin beim trabekulären Kammerwasserabfluss.....	10
1.2.1 Fluktuationen des Kammerwassers	10
1.2.2 Entwicklung des Trabekelwerks	11
1.2.3 Aufbau des Trabekelwerks und Abflusswiderstand.....	12
1.2.4 Intraokulärer Druck (IOD) und primäres Offenwinkelglaukom (POWG)	15
1.2.5 Die Rolle von Fibronectin im Auge	16
1.3 Die Rolle von Fibronectin in der Niere	16
1.3.1 Die Entwicklung der Nieren	17
1.3.2 Struktureller Aufbau der Niere.....	18
1.3.3 Anatomie und Funktion der extrazellulären Matrix in der Niere.....	20
1.3.4 Zystennieren	21
1.3.5 Die Rolle von Fibronectin in der Niere.....	23
1.4 Zielsetzung.....	23
2. Material und Methoden	25
2.1 Materialliste	25
2.1.1 Materialien und Geräte.....	25
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	26
2.1.3 Reagenzien	26
2.1.4 Enzymkits.....	28
2.1.5 Oligonukleotidprimer	28
2.1.6 Antikörper.....	29
2.1.7 Zusammensetzung von Gelen, Lösungen und Puffer	30
2.2 <i>In vivo</i> Versuche.....	32
2.2.1 Transgene Mauslinien.....	32
2.2.1.1 Das Cre / loxP-Rekombinationssystem	32

2.2.1.2 Die mT/mG Reporterlinie.....	32
2.2.1.3 Fn ^{fl/fl} Tiere.....	33
2.2.1.4 Tamoxifen-induzierter, ubiquitärer Knock-out von Fibronectin.....	33
2.2.1.5 Das β B1-CTGF Mausmodell	34
2.2.2 Messung des intraokulären Druckes	34
2.2.3 Herzkammerperfusion	35
2.2.4 Gewebepräparation.....	35
2.2.5 Präparation des korneoskleralen Rings	35
2.2.6 Präparation der Nieren	36
2.3 Molekularbiologische Methoden	36
2.3.1 DNA-Extraktion	36
2.3.2 Polymerasekettenreaktion.....	36
2.3.2.1 FN ^{fl/fl} Genotypisierung.....	37
2.3.2.2 Genotypisierung für die Cre-Rekombinase	38
2.3.2.3 mT/mG – Genotypisierung.....	38
2.3.2.4 β B1- / SV40- Genotypisierung.....	39
2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese	40
2.4 Expressionsanalyse mittels quantitativer real-time RT-PCR	41
2.4.1 RNA-Isolation	41
2.4.2 RNA-Konzentrationsbestimmung	42
2.4.3 cDNA-Synthese.....	42
2.4.4 Quantitative real-time RT-PCR.....	43
2.5 Proteinbiochemische Methoden	44
2.5.1 Protein-Extraktion.....	45
2.5.1.1 Trizol-Methode	45
2.5.1.2 Dissecting-Buffer	45
2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay.....	46
2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	46
2.5.4 Western-Blot	47
2.5.5 Nachweis spezifischer Proteine in Western-Blot Analysen	48
2.6 Histologische Arbeitstechniken.....	49
2.6.1 Einbettung in Tissue-Tek und Herstellung von Gefrierschnitten.....	49
2.6.2 Einbettung in Paraffin und Herstellung von Paraffinschnitten	49
2.6.3 Einbettung in Epon und Herstellung von Semidünn- und Ultradünnschnitten	50
2.6.4 Histologische Färbeverfahren	51

2.6.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	51
2.6.4.2 Pikro-Siriusrot-Färbung	52
2.6.4.3 Färbung nach Richardson.....	52
2.6.4.4 Kontrastierung der Nervi optici mit Paraphenylendiamin (PPD)	53
2.6.4.5 Immunhistochemische Färbeverfahren.....	53
2.6.4.6 Phalloidin-Färbung	55
2.6.5 Mikroskopie	55
2.7 Proteomics-Analysen	56
2.8 Untersuchungen des Urins	56
2.9 Auswertung und Statistik	57
3. Ergebnisse	58
3.1 Die Behandlung mit Tamoxifen-Augentropfen resultiert in einer ubiquitären Aktivierung des Cre/loxP-Systems	58
3.2 Die Rolle von Fibronectin im gesunden Mausauge	61
3.2.1 Die Behandlung mit Tamoxifen-Augentropfen resultiert in einer Reduktion des Fibronectinspiegels im Trabekelwerk	61
3.2.2 Ein Mangel an Fibronectin hat keinen Einfluss auf die Entwicklung des Trabekelwerks.....	63
3.2.3 Die Deletion von Fibronectin im Trabekelwerk resultiert in einer Reduktion von extrazellulärer Matrix	65
3.2.3.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	65
3.2.3.2 Eine Deletion von Fibronectin resultiert in einer verringerten Expression ausgewählter ECM-Komponenten	67
3.2.4 Die Deletion von Fibronectin hat keinen Einfluss auf α -smooth muscle-actin (α -SMA).....	68
3.2.5 Die Deletion von Fibronectin hat keinen Einfluss auf den intraokulären Druck.....	70
3.3 Der Einfluss von Fibronectin beim primären Offenwinkelglaukom.....	70
3.3.1 Eine linsenspezifische Überexpression von CTGF in CD 1 x C57BL/6 Mäusen führt langfristig zu einem Sehnervschaden.....	71
3.3.2 Analyse der Fibronectinmenge im Kammerwinkel von β B1-CTGF Tieren nach Tamoxifen-induzierter ubiquitärer Deletion.....	75
3.3.3 Eine Deletion von Fibronectin hat im β B1-CTGF Mausmodell keinen Einfluss auf die Entstehung des POWG.....	76
3.3.4 Die Deletion von Fibronectin im β B1-CTGF Mausmodell hat keinen Einfluss auf die Proteinmenge von α -SMA	78

3.4 Die Rolle von Fibronectin in der Niere	79
3.4.1 Die ubiquitäre Deletion von Fibronectin resultiert in die Entstehung renaler Zysten	80
3.4.2 Analyse der Fibronectin Expression in der Niere nach Tamoxifen-induzierter ubiquitärer Deletion	81
3.4.3 Pathologische Veränderungen treten isoliert in der Niere auf	83
3.4.4 Analyse der Fibronectin Expression in der Leber nach Tamoxifen-induzierter ubiquitärer Deletion	85
3.4.5 Renale Zysten expandieren mit zunehmendem Alter.....	87
3.4.6 Analyse der renalen Fibronectin Expression am postnatalen Tag 4	88
3.4.7 Analyse der renalen Fibronectin Expression am postnatalen Tag 8	90
3.4.8 Renale Zysten in CAGG-Cre-ER TM / Fn ^{fl/fl} Mäusen resultieren aus einer Aufweitung des Interstitiums	91
3.4.8.1 Histologische Untersuchungen.....	91
3.4.8.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	92
3.4.8.3 Renale Zysten resultieren nicht aus einer Erweiterung von Blutgefäßen oder des Tubulus- und Sammelrohrsystems.....	94
3.4.8.4 Renale Zysten resultieren aus einer Auflockerung des interstitiellen Gewebes	97
3.4.9 Die pathologischen Veränderungen in der Niere führen zu keiner Epithelialisierung des defekten Gewebes	98
3.4.10 Fibronectin und Fibrose	101
3.4.10.1 Die Deletion von Fibronectin resultiert langfristig in einer Akkumulation von Kollagen ringsum die Zysten.....	102
3.4.10.2 Die Deletion von Fibronectin führt zu keiner Aktivitätssteigerung von Myofibroblasten entlang des Zystenepithels	105
3.4.11 Die Deletion von Fibronectin resultiert langfristig in einer Akkumulation von F-Aktin ringsum die Zysten.....	106
3.4.12 Transdifferenzierungsprozesse sind nicht in die Entstehung der Zysten involviert.....	107
3.4.13 Proteomics-Analysen	112
3.4.13.1 Die Deletion von Fibronectin resultiert in einer Zunahme der Proteinexpression ausgewählter Komponenten	113
3.4.13.2 Die Deletion von Fibronectin führt zu einer Abnahme ausgewählter Komponenten	114
3.4.14 Die Deletion von Fibronectin geht mit einem erhöhten Albuminspiegel im Urin einher	115

3.4.15 Die Zystenbildung nach einer Deletion von Fibronectin ist abhängig vom Induktionszeitpunkt	116
3.4.15.1 Eine Deletion von Fibronectin ab dem postnatalen Tag 5 führt ebenfalls zu einer Zystenbildung	116
3.4.15.2 Eine Deletion von Fibronectin ab dem postnatalen Tag 10 führt zu keiner Entwicklung von Zysten	118
3.4.15.3 Eine Deletion ab dem postnatalen Tag 21 resultiert in keine Zystenbildung	120
4. Diskussion	123
4.1 Die postnatale ubiquitäre Deletion von Fibronectin mittels Tamoxifen-Augentropfen	123
4.2 Die Rolle von Fibronectin im gesunden Mausauge	124
4.3 Die Rolle von Fibronectin beim primären Offenwinkelglaukom	132
4.4 Die Rolle von Fibronectin in der Niere	135
4.4.1 Fibronectin und die postnatale Nierenentwicklung	135
4.4.2 Fibronectin im Kontext der polyzystischen Nierenerkrankung	138
5. Zusammenfassung	146
6. Anhang	147
6.1 Literaturverzeichnis	147
6.2 Abkürzungsverzeichnis	156
6.3 Abbildungsverzeichnis	160
6.4 Tabellenverzeichnis	163
6.5 Danksagung	164
7. Erklärung	165

1. Einleitung

1.1 Fibronektin

Fibronektin (Fn) ist ein ubiquitär auftretendes Glykoprotein der extrazellulären Matrix (ECM, *extracellular matrix*), das von vielen verschiedenen Zelltypen (u.a. Fibroblasten, Schwann Zellen, Endothelzellen, Chondrozyten, Epithelzellen und Makrophagen) exprimiert wird (Kurkinen & Alitalo 1979; Jaffe & Mosher 1978; Dessau et al. 1978; Smith et al. 1979; Johansson et al. 1979).

Aufgrund seiner Struktur besitzt das Protein die Fähigkeit mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Bindungspartnern, wie z.B. Komponenten der extrazellulären Matrix, Glykosaminoglykanen und Zelloberflächenrezeptoren, zu interagieren (Mosher & Furcht 1981). Daher sind die Funktionen von Fibronektin äußerst vielfältig. So spielt das Glykoprotein nicht nur beim Aufbau der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle, sondern ist auch in viele zelluläre Prozesse wie Zelladhäsion, -migration, -differenzierung und -proliferation involviert (McDonald et al. 1982; Hynes 1990). Darüber hinaus zeigen Studien eine angiogene und hämostatische Wirkung von Fibronektin auf (Nicosia et al. 1993; Wang et al. 2014).

1.1.1 Struktur

Das Glykoprotein umfasst zwei nahezu identische Polypeptidketten (Molekulargewicht ca. 250 kDa), die am C-terminalen Ende über Disulfidbrücken zu einem Dimer miteinander verknüpft sind. Die Primärstruktur jedes der beiden Monomere setzt sich aus drei sich jeweils wiederholenden Struktureinheiten (Typ I, Typ II und Typ III), den sog. *Fibronectin Repeats* zusammen. So besitzt ein Monomer in der Regel 12 Repeats vom Typ I (mit jeweils 40 Aminosäuren), 2 Repeats vom Typ II (mit jeweils 60 Aminosäuren) und 15 Repeats vom Typ III (mit jeweils 90 Aminosäuren).

Obwohl nur ein Gen für Fibronektin codiert, existieren beim Menschen 20 und in der Maus 12 verschiedene Isoformen des Glykoproteins. Diese Vielfalt entsteht hauptsächlich durch alternatives mRNA Spleißen. So entstehen durch das Spleißen zentral angeordneter Typ III Repeats die EDA (*extra domain A*) und EDB (*extra domain B*) Domänen. Eine weitere Domäne, die durch Spleißen entsteht, ist die IIICS (*type III connecting segment*) Domäne (White & Muro 2011).

Im Organismus tritt Fibronektin entweder als lösliches Fibronektin im Blutplasma (Plasma-Fibronektin, pFn) oder als unlösliche Variante in der extrazellulären Matrix (zelluläres Fibronektin, cFn) auf. Strukturell unterscheiden sich diese beiden Erscheinungsformen hauptsächlich bezüglich der EDA / EDB Domänen: Plasma-Fibronektin wird von den Hepatozyten der Leber synthetisiert und besitzt keine der beiden Domänen. Im Gegensatz dazu besitzt zelluläres Fibronektin, welches unter anderem von Fibroblasten, Epithelzellen und Makrophagen produziert wird, die EDA und / oder die EDB Domäne. Zusätzlich zum Spleißen können auch posttranslationale Ereignisse wie Glykosylierung, Phosphorylierung oder Sulfatierung die Struktur und Funktion von Fibronektin beeinflussen (Hynes 1990; Romberger 1997).

1.1.2 Interaktionspartner

Der modulare Aufbau von Fibronektin erlaubt die Bindung des Proteins an eine Vielzahl unterschiedlicher Interaktionspartner. So besitzt Fibronektin unter anderem die Fähigkeit Bindungen mit Fibrin, Kollagen, Fibrillin und verschiedenen Glykosaminoglykanen – wie Heparin, Heparansulfat und Hyaluronan - einzugehen (Makogonenko et al. 2002; Kleinman et al. 1981; Sabatier et al. 2009; Yamada et al. 1980).

Die Bindung an Zellen wird über verschiedene konstitutiv oder alternativ exprimierte Module des Glykoproteins reguliert und in erster Linie über Integrine vermittelt (Johansson et al. 1997).

Die zentrale Bindungsdomäne von Fibronektin beinhaltet das konstitutiv exprimierte RGD-Bindemotiv, das sich im zehnten Typ III *Repeat* befindet. Inzwischen ist bekannt, dass nicht nur der Hauptrezeptor $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin, sondern auch verschiedene andere Integrine, wie die αv -Integrine oder die $\alpha 8 \beta 1$ -, $\alpha 9 \beta 1$ - und $\alpha 11 \beta 3$ -Integrine über diese Sequenz mit dem Glykoprotein interagieren. Eine zusätzliche Beteiligung der Synergie-Domäne (PHSRN), die sich im benachbarten *Repeat* III-9 befindet, bewerkstelligt für $\alpha 5 \beta 1$ und $\alpha 11 \beta 3$ -Integrine eine maximale Bindungsaffinität (Leiss et al. 2008). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine Mitwirkung der EDA Domäne ebenfalls die Affinität des Ligand-Rezeptor-Komplexes verstärken kann (Manabe et al. 1997).

Neben dem RGD-Bindemotiv kann Fibronectin noch über zwei weitere – durch alternatives Spleißen determinierte - Bindungsstellen mit Zellen interagieren. Die EDGIHEL-Sequenz der EDA-Domäne ermöglicht eine Interaktion mit $\alpha 9\beta 1$ - und $\alpha 4\beta 1$ -Integrinen (Liao et al. 2002). Zudem wird eine Bindung von Fibronectin an $\alpha 4\beta 1$ - und $\alpha 4\beta 7$ -Integrine über den LDV-Abschnitt des IIICS-Moduls gewährleistet (Johansson et al. 1997).

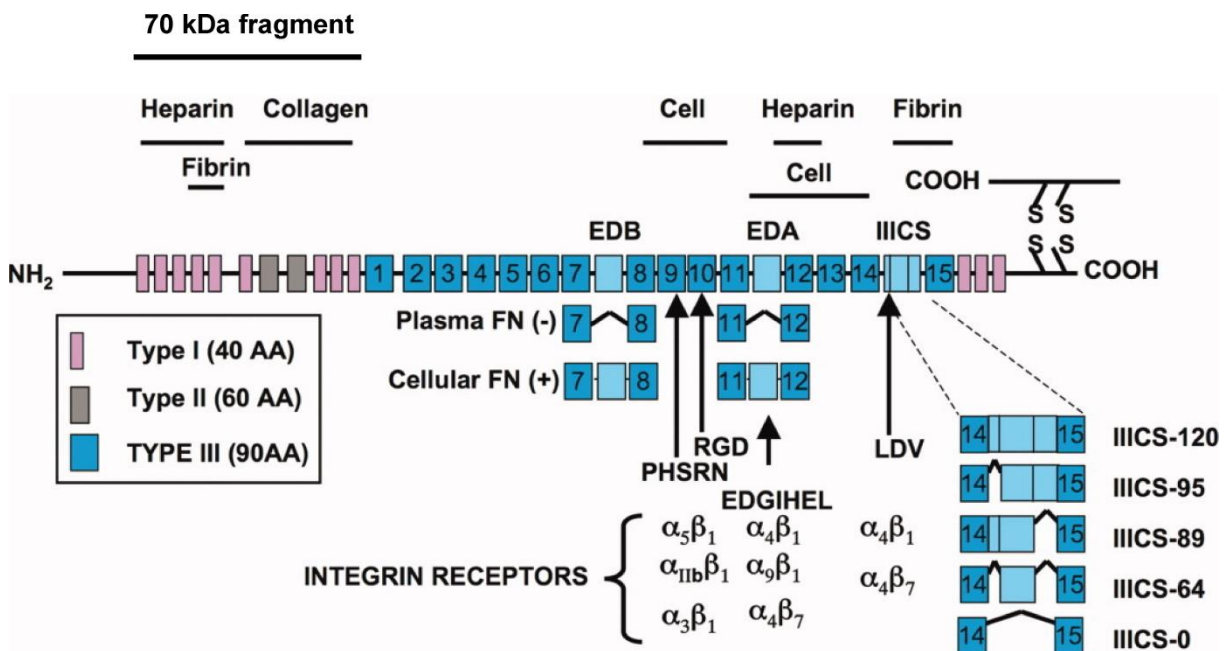


Abbildung 1: Primärstruktur eines Fibronectin Monomers mit Bindungsstellen für Interaktionspartner und Spleiß-Varianten

Ein Fibronectin Monomer beinhaltet 12 Repeats des Typs I, 2 Repeats vom Typ II, 15 Repeats des Typs III, sowie jeweils eine EDA, EDB und IIICS-Domäne. Die Module des Typs I und II am N-terminalen Ende bilden das 70 kDa-Fragment. Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen der EDA, EDB und/oder IIICS-Domäne. Ferner sind die konstitutiv (RGD-Bindungsdomäne, Synergie-Domäne (PHSRN)) und alternativ (EDGIHEL/EDA-Domäne, LDV/IIICS-Segment) exprimierten Bindungsstellen für Zellen inklusive der jeweiligen Integrin-Bindungspartner abgebildet. *Modifiziert aus White & Muro, 2011.*

1.1.3 Fibronectin und die extrazelluläre Matrix

Als Bestandteil der extrazellulären Matrix besitzt Fibronectin die Fähigkeit, ein Netzwerk aus fibrillären Fasern aufzubauen. Studien weisen in diesem Zusammenhang auf eine regulatorische Rolle des Glykoproteins bei der Zusammensetzung und Stabilität der extrazellulären Fibrillen bzw. der Zell-Matrix-Adhäsion hin (Sottile & Hocking 2002). So zeigten zum Beispiel Velling und Kollegen (2002) auf, dass die Polymerisation von Kollagen die Präsenz eines Fibronectin-

Netzwerks erfordert. Ähnliches konnte auch hinsichtlich Fibrillin beobachtet werden (Sabatier et al. 2009).

Neben der Integration der beiden o.g. Komponenten ist Fibronektin auch in der Lage mit sich selbst zu interagieren und so den eigenen Proteinanteil in der extrazellulären Matrix zu erhöhen. Hierbei wird nicht nur zelluläres, sondern auch Plasma-Fibronektin in das Gewebe eingelagert (Oh et al. 1981).

Da im Normalfall die Bindungsstellen für die Eigendissoziation des Glykoproteins im dimerisierten Zustand nicht zugänglich sind, ist die Auflösung der globulären Konformation eine wichtige Voraussetzung für die Eigenvernetzung der Fibronektinmoleküle (Williams et al. 1982; Wierzbicka-Patynowski 2003).

Hierfür ist zunächst eine Interaktion von Fibronektin mit Zelloberflächenrezeptoren notwendig, wobei offenbar die Bindungseigenschaften des 70 kDa Fragments am N-Terminus des Glykoproteins eine essentielle Rolle spielen (Sottile & Mosher 1997). Die Bindung von Fibronektin an Integrine führt zu einer Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts, einer erhöhten Kontraktilität der Zelle, sowie einer Aneinanderlagerung von Oberflächenrezeptoren. Dadurch kommt es zu einer Entfaltung des Proteins und die entsprechenden Domänen für die Bindung eines weiteren Fibronektin Moleküls werden freigelegt. Nach diesem Prinzip können mehrere Fibronektin-Proteine zu Fibrillen aneinandergelagert oder auch Zellen miteinander verknüpft werden (Schwarzbauer 1991; To & Midwood 2011).

1.1.4 Fibronektin und die Embryogenese

Schon in den 90er Jahren konnten George et al. (1993) zeigen, dass eine konstitutive Deletion von Fibronektin im Mausmodell relativ früh (Embryonaltag 8) zu schwerwiegenden Entwicklungsstörungen führt, die schlussendlich mit einer Letalität im Embryonalalter einhergehen. So konnte in Tieren mit einem Mangel an Fibronektin eine Fehlbildung des Mesoderms, des Neuralrohrs und des vaskulären Systems beobachtet werden (George et al. 1993). Nachfolgende Studien dokumentierten, dass eine Deletion einzelner alternativer Domänen (EDA oder EDB) embryonal nicht zum Tode führt, während die Deletion beider Module ebenfalls in einer Letalität des Embryos resultiert (Muro et al. 2003; Fukuda et al. 2002; Astrof et al. 2007). Takahashi und Kollegen (2007) wiesen zudem eine essentielle Rolle des

RGD-Bindemotivs nach, also desjenigen Abschnitts, der die Bindung von Fibronektin an Integrine und damit die Interaktion des Glykoproteins mit Zellen vermittelt.

1.2 Die Rolle von Fibronektin beim trabekulären Kammerwasserabfluss

Im Inneren des Auges werden drei Räume voneinander abgegrenzt: die vordere Augenkammer, die hintere Augenkammer und das Augeninnere, der Glaskörper (*Corpus vitreum*). Die vordere Augenkammer (*Camera anterior*) reicht von der Kornea bis an die Iris. Sie ist über die *Pupille* mit der hinteren Augenkammer (*Camera posterior*), die von der Hinterfläche der Iris, der Linse, dem Ziliarkörper und dem vorderen Anteil des Glaskörpers begrenzt wird, verbunden. Beide Augenkammern sind mit Kammerwasser (*Humor aquosus*) gefüllt, das zum einen der Versorgung des bradytrophen Gewebes im Auge (Kornea, Linse, Trabekelwerk), zum anderen der Aufrechterhaltung des intraokulären Druckes dient. Im gesunden Auge stehen Kammerwassersekretion und -abfluss im Gleichgewicht. Wird dieses Gleichgewicht, z.B. durch Fehlbildungen oder pathologische Veränderungen des Trabekelwerks, gestört, kann dies im Auge zu schwerwiegenden Schädigungen führen (Faller & Schünke 2012; Aumüller et al. 2007).

1.2.1 Fluktuationen des Kammerwassers

Das Kammerwasser wird aktiv von Zellen des Ziliarkörperepithels in die hintere Augenkammer sezerniert, gelangt über die Pupille in die vordere Kammer und fließt dort im Bereich des Kammerwinkels ab. Die intraokuläre Flüssigkeit verlässt hierbei das Auge über zwei unterschiedliche Wege: den uveoskleralen oder trabekulären Abflussweg. Beim uveoskleralen Abfluss fließt das Kammerwasser über die Vorderseite des Ziliarkörpers, der in diesem Bereich kein Epithel aufweist, in dessen interstitielle Räume und gelangt zwischen den Muskelbündeln des Ziliarmuskels in die Kapillaren des Ziliarkörpers bzw. über die supraziliaren / suprachoroidalen Räume in die skleralen Lymphgefäße. Im trabekulären Abflussweg hingegen strömt das Kammerwasser durch das Trabekelwerk und die juxtakanalikuläre Region (juxtakanalikuläres Gewebe und Endothel des Schlemm-Kanals) in sklerale Sammelgefäße, bevor es über Kammerwasservenen das episklerale Venensystem

erreicht. Hierbei kommt es natürlicherweise zu einem Abflusswiderstand und damit einhergehend zum Aufbau eines intraokulären Drucks (Nilsson 1997; Tamm 2013).

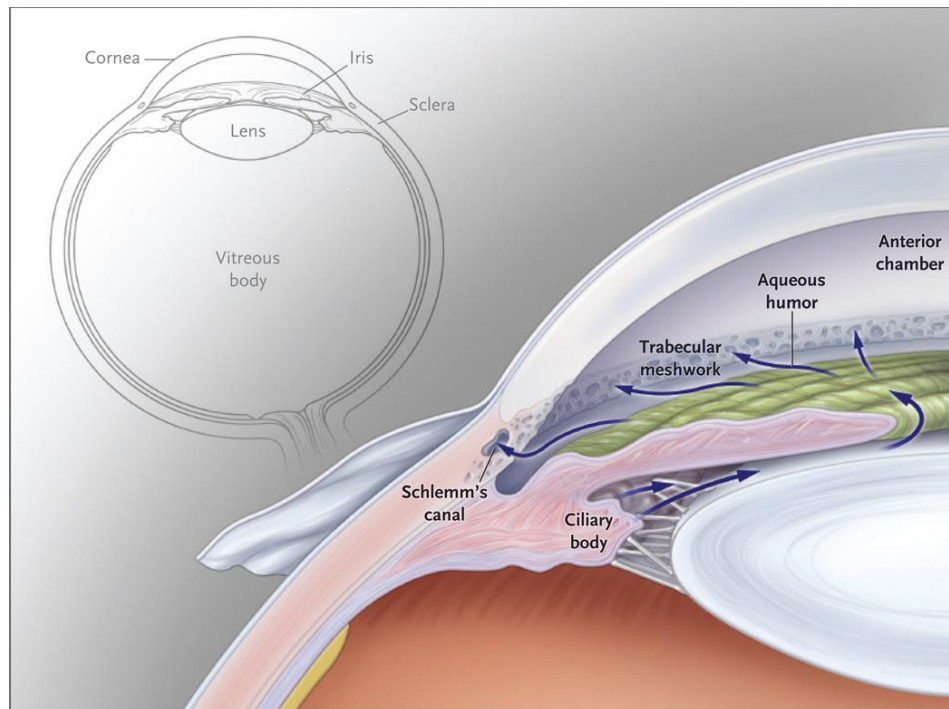


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Kammerwasserflusses im Auge

Kammerwasser wird von Zellen des Ziliarkörperepithels in die hintere Augenkammer sezerniert, gelangt durch die Pupille in die vordere Augenkammer und fließt im Bereich des Kammerwinkels ab. Beim trabekulären Abflussweg fließt das Kammerwasser über das Trabekelwerk in den Schlemm-Kanal und schließlich in das episklerale Venensystem. Alternativ verlässt die intraokuläre Flüssigkeit das Auge über den uveoskleralen Abfluss. *Kwon et al. 2009*

1.2.2 Entwicklung des Trabekelwerks

Beim Menschen beginnt die Morphogenese des Trabekelwerks etwa in der 16. Schwangerschaftswoche. Zu diesem Zeitpunkt bilden mesenchymale Neuralleistenzellen im Kammerwinkel die Anlagen des Trabekelwerks. Diese sind zunächst noch relativ dicht angeordnet, werden aber im weiteren Entwicklungsverlauf (ab dem 5. Monat) durch Spalträume voneinander getrennt. Zusätzlich wachsen einzelne sklerale Gefäße, die die Anlage des Schlemm -Kanals bilden, vom äußeren Auge zum Kammerwinkel hin ein. Bis zur Geburt differenzieren die mesenchymalen Zellen zu den typischen Lamellen des uvealen und korneoskleralen Trabekelwerks aus und sind mit dem Schlemm -Kanal verbunden. Eine Rückverlagerung der Iris führt schließlich zu einer direkten Verbindung des Trabekelwerks mit dem Kammerwasser der *Camera anterior* (Tamm & Ohlmann 2012).

Die Entwicklung des Trabekelwerks im Mausauge entspricht im Wesentlichen der Morphogenese im Menschen, unterscheidet sich aber maßgeblich bezüglich des zeitlichen Rahmens. So finden die oben genannten Prozesse erst nach der Geburt (ab dem postnatalen Tag 4) statt. Demnach ist das Mausauge, das auch hinsichtlich des strukturellen Aufbaus große Ähnlichkeit mit dem humanen Auge aufweist, für die Erforschung der Entwicklung des Trabekelwerks, auf Grund seiner Zugänglichkeit, sehr gut geeignet (Smith et al. 2001).

1.2.3 Aufbau des Trabekelwerks und Abflusswiderstand

Strukturell wird das Trabekelwerk in drei Regionen unterteilt: das uveale Trabekelwerk (UTM, *uveal trabecular meshwork*), das korneosklerale Trabekelwerk (CTM, *corneoscleral trabecular meshwork*) und das juxtakanalikuläre Gewebe (JCT, *juxtacanalicular tissue*). Sowohl das uveale, als auch das korneosklerale Trabekelwerk werden durch mehrere Lagen von Lamellen charakterisiert, die über Bindegewebsstränge oder Zellfortsätze miteinander verbunden sind. Den Kern dieser Lamellen bilden kollagene und elastische Fasern, die über eine Basalmembran von den sie umhüllenden Trabekelwerkszellen getrennt sind (Marshall et al. 1991; Gong et al. 1989; Tamm 2013). Das uveale Trabekelwerk umfasst 1-3, das korneosklerale Trabekelwerk 8-15 Lagen von Lamellen. Der balkenähnliche Aufbau resultiert in einer schwammartigen Struktur, deren Poren zum Schlemm -Kanal hin immer engmaschiger verlaufen. Das Kammerwasser gelangt durch diese Poren in das juxtakanalikuläre Gewebe, dem flächenmäßig kleinsten Anteil des Trabekelwerks. Es besteht im Wesentlichen aus 2-5 Lagen sternförmiger Zellen mesenchymalen Charakters, die in eine extrazelluläre Matrix eingebettet sind. Die Zellen des juxtakanalikulären Gewebes sind über *Zonulae adherentes* teilweise untereinander, teilweise mit Endothelzellen des Schlemm -Kanals verbunden (Tamm 2009). Die extrazelluläre Matrix des juxtakanalikulären Gewebes ist einem ständigen Umbau unterworfen und beinhaltet neben fibrillären Bestandteilen wie Kollagen und Fibronectin, auch Glykosaminoglykane (Dermatansulfat, Chondroitinsulfat, Hyaluronan) und Proteoglykane (u.a. Decorin) (Acott & Kelley 2008). Darüber hinaus ist der sogenannte *cribriforme Plexus* ein wichtiger Bestandteil dieser Region. Dieses Netzwerk aus elastischen Fasern verläuft tangential zum Schlemm -Kanal und spielt bei der Adhäsion des Schlemm -Kanal Endothels an das juxtakanalikuläre Gewebe eine wichtige Rolle. Hierbei wird die Anheftung durch Hüllmaterial, das einen Kern aus Elastin umgibt und dessen Zusammensetzung bisweilen noch unklar ist,

gewährleistet (Rohen et al. 1981). Nach der Passage des Kammerwassers durch den Extrazellulärraum des juxtakanalikulären Gewebes gelangt es schließlich über das Endothel in den Schlemm -Kanal. Ähnlich wie vaskuläre Gefäße wird das Endothel des Schlemm -Kanals durch lange, abgeflachte Zellen gebildet, die über *Tight Junctions* miteinander verknüpft sind (Ethier 2002). Dennoch weist das „modifizierte, kapillare Blutgefäß“ (Tamm 2013) einige Besonderheiten auf: So ist zum Beispiel in der Region, in der das Kammerwasser in den Schlemm -Kanal eintritt, keine durchgehende Basalmembran vorhanden. Dies führt aufgrund des Strömungsdrucks des Kammerwassers zur Bildung sogenannter „Giant Vacuoles“ – Einstülpungen von Endothelzellen in das Lumen des Schlemm -Kanals (Johnstone & Grant 1973). Ein weiteres Charakteristikum ist die Präsenz von Poren, die sowohl intra- als auch interzellulär ausgebildet werden können (Ethier et al. 1998).

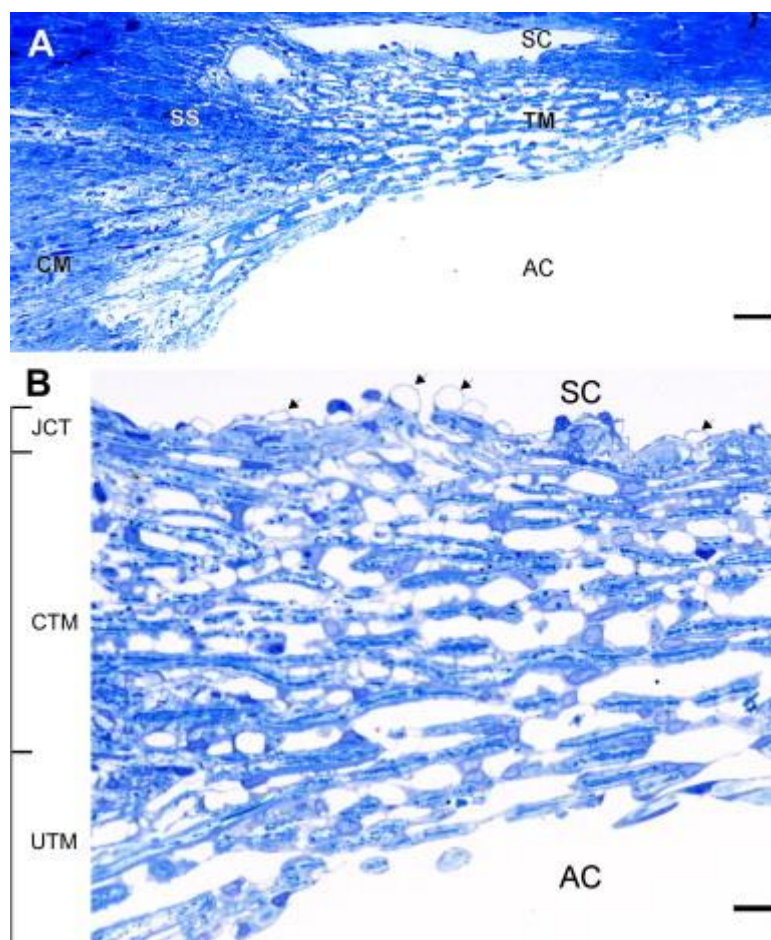


Abbildung 3: Meridionalschnitt durch das Trabekelwerk

Im unteren Bild deuten Pfeile „Giant Vacuoles“ (Einstülpungen des Schlemm -Kanal Endothels) an. SS = Skleralsporn, CM = Ziliarmuskel, SC = Schlemm-Kanal, TM = Trabekelwerk, JCT = juxtakanalikuläres Gewebe, CTM = kornosklerales Trabekelwerk, UTM = uveales Trabekelwerk, AC = Vorderkammer. Tamm 2009

Bisher ist noch nicht abschließend geklärt, in welcher Region des Trabekelwerks der Abflusswiderstand lokalisiert ist; Studien deuten jedoch darauf hin, dass sowohl die Poren des Schlemm -Kanal Endothels, als auch das unmittelbar darunterliegende juxtakanalikuläre Gewebe einen wesentlichen Einfluss auf die Abflussfaszilität ausüben (Johnson 2006). Braakman et al. (2015) konnten in diesem Zusammenhang eine positive Korrelation zwischen dem Abflussweg des Kammerwassers und der Porendichte im Endothel des Schlemm -Kanals nachweisen. Die Tatsache, dass eine erhöhte Aktivität von Matrix-Metalloproteasen – also derjenigen Enzyme, die eine Spaltung der extrazellulären Matrix bewerkstelligen – die Abflussfaszilität reversibel erhöht, unterstützt zudem die Annahme der Einwirkung von extrazellulärer Matrix auf den Kammerwasserabflusswiderstand (Bradley et al. 1998). In Übereinstimmung mit diesen Daten gilt heute die sogenannte „*Funneling*“-Hypothese als sehr wahrscheinlich: Demnach leiten trichterförmige Abflusswege im juxtakanalikulären Gewebe das Kammerwasser gezielt zu den Poren des Schlemm -Kanal Endothels. Dadurch wird der Abfluss des Kammerwassers stark eingeschränkt und es baut sich ein entsprechender Widerstand auf (Johnson et al. 1992; Overby et al. 2010).

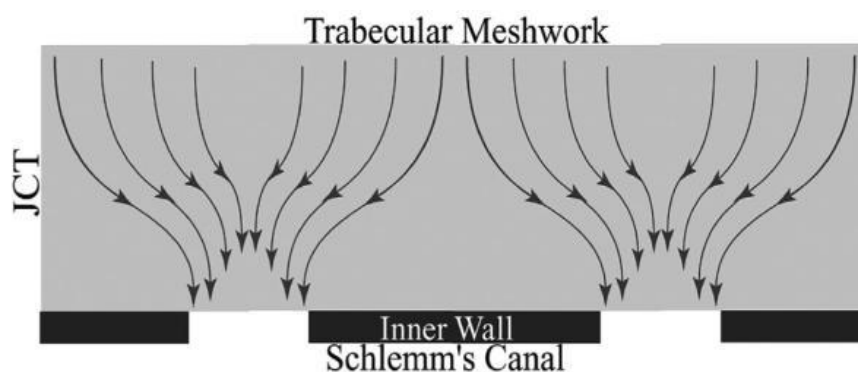


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Kammerwasserabflusses gemäß der „*Funneling*“-Hypothese

Trichterförmige Abflusswege im juxtakanalikulären Gewebe leiten das Kammerwasser gezielt zu den Poren im Schlemm-Kanal. Der Abfluss wird eingeschränkt und es baut sich ein Widerstand und damit der intraokuläre Druck auf. JCT = juxtakanalikuläres Gewebe. Overby et al. 2010

Zudem wird die Abflussfaszilität des Kammerwassers vom kontraktilen Tonus des Trabekelwerks beeinflusst. Hierbei spielen zwei kontraktile Systeme, die jeweils antagonistisch wirken, eine wichtige Rolle: Ziliarmuskelzellen und Trabekelwerkszellen bzw. Zellen des juxtakanalikulären Gewebes. Diese sind in der Lage, die Geometrie der Abflusswege in der juxtakanalikulären Region so zu verändern, dass es zu einer Senkung bzw. Erhöhung des Abflusswiderstands kommt. Eine Kontraktion des Ziliarmuskels führt hierbei zu einer Senkung, eine

Kontraktion der Trabekelwerkszellen zu einer Erhöhung des Widerstands (Wiederholdt et al 2000; Tamm 2013).

1.2.4 Intraokulärer Druck (IOD) und primäres Offenwinkelglaukom (POWG)

Im gesunden Auge entspricht die Sekretionsrate des Kammerwassers in etwa der trabekulären Abflussrate. Ist der Abflusswiderstand im Trabekelwerk z.B. aufgrund von krankhaften Veränderungen pathologisch erhöht, geht dies mit einem Anstieg des intraokulären Drucks einher. Langzeitstudien zeigten auf, dass der Augennendruck den Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines primären Offenwinkelglaukoms, der weltweit zweithäufigsten Ursache für Sehverschlechterung und Blindheit, darstellt (Bourne et al. 2016; Kass et al. 2002; Leske et al. 2003). Das Glaukom ist eine progressiv voranschreitende Neuropathie des Sehnervs. Im Krankheitsverlauf kommt es aufgrund einer Degeneration von Sehnervaxonen zu einer morphologischen Veränderung (Exkavation) des Sehnervenkopfes. Dies geht mit einem Absterben retinaler Ganglienzellen einher und führt schlussendlich zu Gesichtsfeldausfällen (Kwon et al. 2009; Quigley 2011; Weinreb et al. 2014).

Beim primären Offenwinkelglaukom (POWG) tritt im juxtaanalikulären Gewebe zudem eine erhöhte Menge an fibrillärem Material auf. Die pathologischen Veränderungen betreffen hierbei hauptsächlich das Hüllmaterial der elastischen Fasern im cribriformen Plexus (sog. SD-Plaques) (Tekas & Lütjen-Drecoll, 2009). Studien konnten in diesem Zusammenhang eine Korrelation zwischen dem Sehnervenschaden und der Quantität der SD-Plaques nachweisen (je höher die Menge der SD-Plaques, desto größer der Sehnervenschaden) (Gottanka et al. 1997). Die gesteigerte Menge an extrazellulärer Matrix wird mit einer vermehrten Aktivität von Transforming Growth Factor- β 2 (TGF- β 2) in Verbindung gebracht, da Patienten mit einem POWG eine erhöhte Konzentration dieses Signalmoleküls im Kammerwasser aufweisen. TGF- β 2 wirkt stimulierend auf Trabekelwerkszellen und regt diese zur vermehrten Produktion von extrazellulärer Matrix an. Darüber hinaus zeigten *in vitro* Studien auf, dass TGF- β die Expression von α -smooth muscle-actin (α -SMA) und die Ausbildung eines Aktinzytoskeletts positiv beeinflusst (Fuchshofer & Tamm 2012). Rasterkraftmikroskopische Auswertungen bestätigten eine erhöhte Rigidität des Trabekelwerks im glaukomatösen Auge (Last et al. 2011).

1.2.5 Die Rolle von Fibronektin im Auge

Im Auge wird Fibronektin in vielen verschiedenen Regionen exprimiert. So konnten Sramek et al. (1987) im Nagerauge ein Auftreten des Glykoproteins sowohl in der Kornea, im Trabekelwerk, in Iris und Ziliarkörper, als auch in retinalen Blutgefäßen und der Choroidea nachweisen. Immunhistochemische Analysen des menschlichen Auges zeigten zudem ein Vorkommen des Proteins in der Austrittsregion der Axone aus dem Auge, der *Lamina cribrosa*, auf (Kohno et al. 1987).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen in Verbindung mit Immunogold-Färbungen ermöglichten in diesem Zusammenhang eine genaue Lokalisationsanalyse von Fibronektin im Trabekelwerk. So war Fibronektin in der Basalmembran von Lamellen des uvealen, sowie des korneskleralen Trabekelwerks und längs des Schlemm -Kanals nachweisbar. Darüber hinaus war das Protein als Bestandteil des Hüllmaterials im cribriformen Plexus nachweisbar (Hann et al. 2001). *Ex vivo* Perfusionsexperimente des menschlichen Auges zeigten auf, dass eine Hemmung der Heparin II - Bindedomäne von Fibronektin zu einer Ablösung des Schlemm -Kanal Endothels vom darunterliegenden juxtakanalikulären Gewebe und einer erhöhten Kammerwasserabflussfaszilität führt (Santas et al. 2003).

Diese Daten legen insgesamt die Vermutung nahe, dass Fibronektin den Kammerwasserabfluss und somit auch den intraokulären Druck beeinflussen kann.

1.3 Die Rolle von Fibronektin in der Niere

Die paarig -angelegten Nieren (*Ren*) übernehmen im Körper eine Vielzahl essentieller Funktionen. So sind sie nicht nur für die Filtration des Blutes und die Ausscheidung harnpflichtiger Stoffwechselprodukte verantwortlich, sondern auch an der Regulation des Salz- und Wasserhaushalts bzw. Säure-Basen-Haushalts beteiligt. Zudem produziert die Niere das Hormon Erythropoetin und beeinflusst somit die Bildung roter Blutkörperchen. Das Organ wirkt außerdem beim Vitamin-D Stoffwechsel mit und steuert über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System den systemischen Blutdruck (Aumüller et al. 2007).

1.3.1 Die Entwicklung der Nieren

Bei den Amnioten durchläuft die Niere im Wesentlichen drei Entwicklungsstadien, die fließend ineinander übergehen: Vorniere (*Pronephros*), Urniere (*Mesonephros*) und Nachniere (*Metanephros*).

Die Vorniere entwickelt sich aus dem intermediären Mesoderm; durch mesenchymal-epitheliale Differenzierungsprozesse entsteht der Vornierengang, der sich später als Urnierengang kaudal fortsetzt. Darüber hinaus kommt es kranial zur Formation von *zervikalen Nephrotomen*. Diese bleiben jedoch funktionslos und bilden sich kurze Zeit später wieder zurück. Beim Menschen tritt diese Phase zwischen der 3. und 5. Woche auf, in der Maus beginnt die Nierenentwicklung ab Embryonaltag 8,5 (Graumann & Sasse, 2004; Davidson 2008).

Der wohl bedeutendste Teil des *Mesonephros* ist der Wolff-Gang, der sich kaudal an den Vornierengang anschließt. Er induziert die Bildung der Urniere; diese besitzt bereits funktionsfähige Nephrone (Glomeruli und Urnierenkanälchen), welche sich im weiteren Entwicklungsverlauf jedoch ebenfalls wieder zurückbilden. Der Mensch durchläuft dieses Entwicklungsstadium der Niere von der 4. bis zur 8. Schwangerschaftswoche, die Maus von embryonalem Tag 9 bis 15,5 (Graumann & Sasse, 2004; Davidson 2008).

Die Nachniere stellt das letzte – und auch verbleibende – Stadium der Nierenentwicklung dar. In der 5./6. Schwangerschaftswoche (Mensch) bzw. ab Embryonaltag 10,5 (Maus) wächst eine sogenannte Ureterknospe aus dem distalen Anteil des Wolff-Ganges in das sie umgebende mesenchymale Gewebe ein und induziert dort eine Differenzierung zum metanephrogenem Blastem. Das metanephrogene Blastem wiederum umrahmt die Ureterknospe „kappenförmig“ (*cap mesenchyme*) und erwirkt – über die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren und sekretierter Moleküle – ihr Längenwachstum und dichotome Teilungen. Schlussendlich führen die Wechselwirkungen zwischen Ureterknospe und dem metanephrogenem Blastem zur Entstehung verschiedener renaler Strukturen. Hierbei entwickeln sich Ureter, Nierenbecken (mit Nierenkelchen) und Sammelrohre aus der ursprünglichen Ureterknospe, während Nephrone aus dem metanephrogenem Gewebe ausdifferenzieren. Beim Menschen nimmt die Niere ihre Funktion im Alter von etwa 8 Wochen auf. Bei der Maus wird die Expression von Genen, die in die embryonale Entwicklung bzw. Organentwicklung eingebunden sind, erst 5 – 7 Tage nach der Geburt deutlich herunterreguliert, so dass vom Abschluss

der Entwicklung zu diesem Zeitpunkt ausgegangen werden kann (Graumann & Sasse, 2004; Davidson 2008; Wu et al. 2013).

1.3.2 Struktureller Aufbau der Niere

Histologisch wird die Niere in das innere Nierenmark (*Medulla renalis*) und die außen liegende Nierenrinde (*Cortex renalis*) unterteilt.

Die *Medulla* besteht im Wesentlichen aus kegelförmigen *Pyramides renales*, die die Nierenkanälchen (*Tubuli*) und Sammelrohre enthalten. Sie ragen mit ihrer Spitze (*Papilla renalis*) in den Nierenkelch (*Calix renalis*) und werden, aufgrund der im Längsschnitt erkennbaren Zonen und Streifen, in eine dunkle Außenzone (Außen- und Innenstreifen) und helle Innenzone gegliedert.

Der *Cortex* umgibt die renalen Pyramiden lateral und trennt diese mittels seiner *Columnae renales* voneinander ab. In der Nierenrinde sind etwa 80 % der Nephronen lokalisiert (Aumüller et al. 2007; Silverthorn 2009).

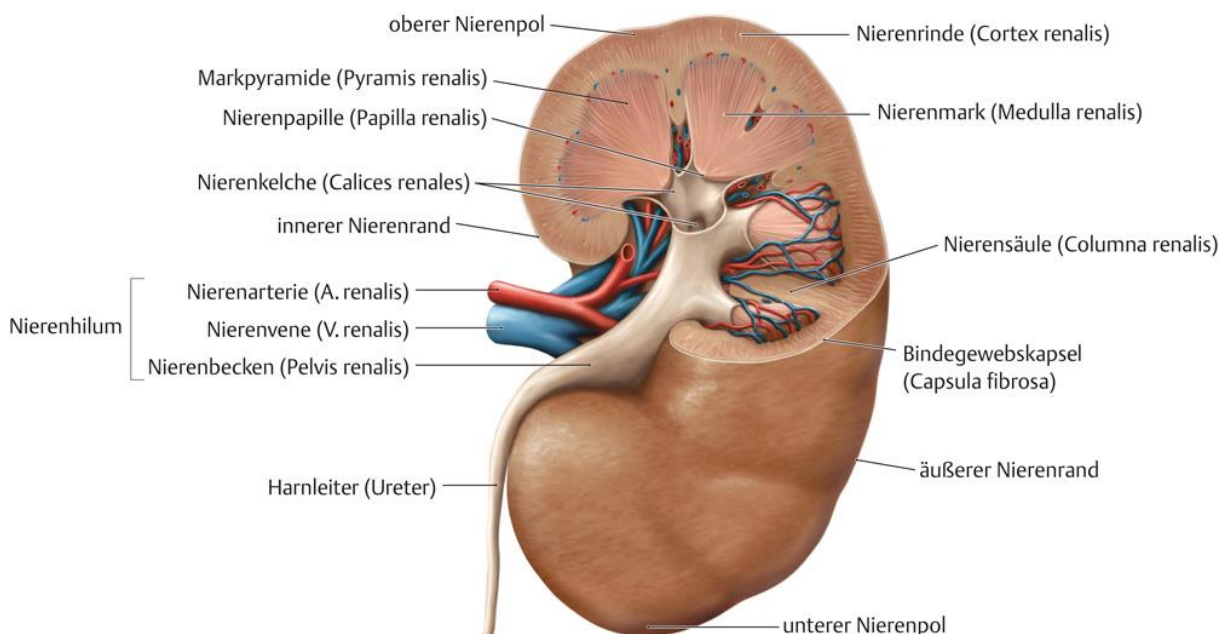


Abbildung 5: Aufbau der Niere

Die Niere setzt sich aus der Nierenrinde und dem Nierenmark zusammen. Die Nierenrinde umgibt das Nierenmark und trennt mittels seiner Nierensäulen die renalen Pyramiden voneinander ab. Diese ragen mit ihrer Spitze in den Nierenkelch. Die Nierenkelche gehen in das Nierenbecken über. Georg Thieme Verlag, 2015

Ein *Nephron* ist die kleinste funktionelle Einheit der Niere. Es umfasst zum einen das Nierenkörperchen (*Malpighi-Körperchen*, *Corpusculum renale*), zum anderen das

Nierenkanälchen (*Tubulus renalis*). Das Nierenkörperchen *per se* besteht wiederum aus einem Kapillarknäuel (*Glomerulus*) und der sie umgebenden Bowman-Kapsel (*Capsula glomerularis*). Im *Corpusculum renale* findet durch Ultrafiltration des Blutes die Produktion des Primärharns statt, der anschließend über das Nierenkanälchen in das Sammelrohr abtransportiert, konzentriert und modifiziert wird. Der *Tubulus renalis* lässt sich aufgrund morphologischer und funktioneller Charakteristika in vier verschiedene, unmittelbar aufeinanderfolgende Abschnitte unterteilen. Der Primärharn wird zunächst in den proximalen Tubulus aufgenommen. Dieser besitzt ein azidophiles Epithel, welches apikal *Tight junctions* und einen Bürstensaum ausbildet. In diesem Abschnitt werden zahlreiche Substanzen aus dem Primärharn (Wasser, Glukose, Aminosäuren, sowie Elektrolyte wie Natrium, Kalium, Phosphat und Chlorid) rückresorbiert und harnpflichtige Stoffe (z.B. Protonen, Ammoniak und Harnsäure) sezerniert. Der Intermediärtubulus verbindet den proximalen Tubulus mit dem distalen Tubulus. Er weist nur ein sehr flaches Epithel ohne Bürstensaum auf und bildet den dünnen Teil der Henle-Schleife. Hier erfolgt – anhand des Gegenstromprinzips - der Großteil der Resorption von Wasser. Das Epithel des distalen Tubulus ist dem des proximalen Tubulus sehr ähnlich, weist jedoch keinen Bürstensaum auf. In diesem Abschnitt werden u.a. Natrium, Chlorid, Magnesium und Calcium rückresorbiert. Schließlich fließt der Harn über den Verbindungstubulus in das Sammelrohr. Dort findet nochmals eine Wasserresorption bzw. Harnkonzentrierung statt, die hormonell über das antidiuretische Hormon (ADH) gesteuert wird. Über den Nierenkelch bzw. das Nierenbecken fließt der modifizierte Urin schließlich in den Harnleiter ab (Aumüller et al. 2007; Behrends et al. 2010).

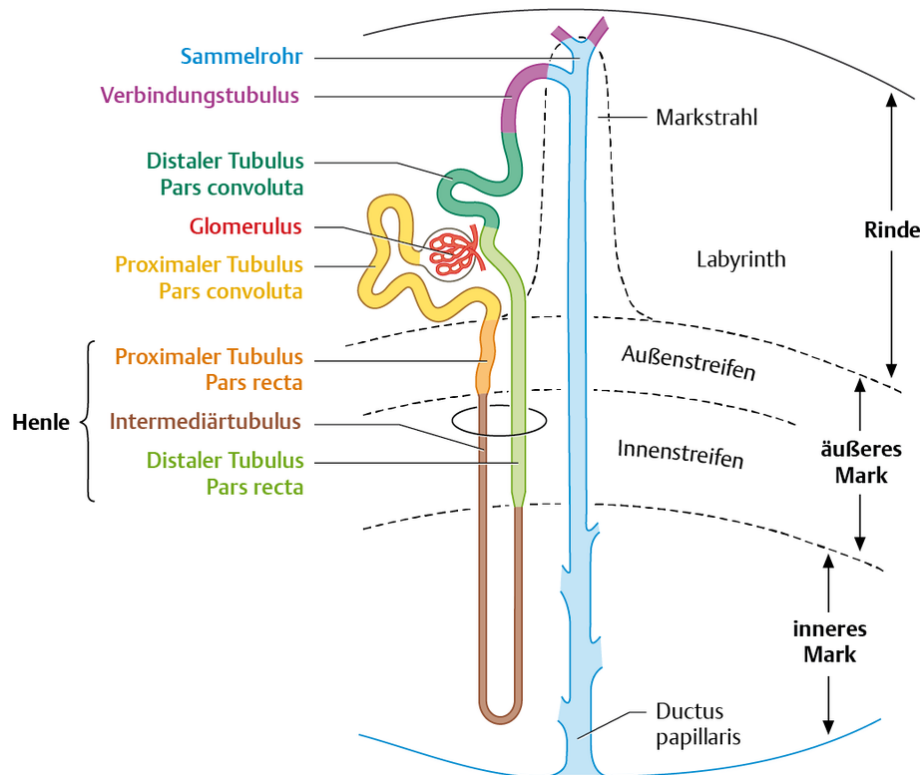


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Nephrons

Ein Nephron umfasst das Nierenkörperchen (Bowman-Kapsel und Glomerulus) und das Nierenkanälchen (Tubulus). Letzteres wird in folgende Abschnitte unterteilt: proximaler Tubulus – Intermediärtubulus – distaler Tubulus – Verbindungstubulus. Der Verbindungstubulus geht in das Sammelrohr über. Lüllmann-Rauch, 2012

1.3.3 Anatomie und Funktion der extrazellulären Matrix in der Niere

Als *renales Interstitium* bezeichnet man den Raum zwischen den Tubuli und Blutgefäßen der Niere, der sich zum einen aus interstitiellen Zellen, zum anderen aus Komponenten der extrazellulären Matrix und interstitieller Flüssigkeit zusammensetzt. Diese Region spielt nicht nur während der Entwicklung und bei Reparaturmechanismen eine wichtige Rolle, sondern ist auch für die Bildung von Erythropoetin (zur Blutbildung) und Renin (zur Regulation des Blutdrucks) essentiell. Darüber hinaus geht eine Erkrankung der Niere häufig mit einer pathologischen Veränderung im interstitiellen Bereich einher (Lemley & Kriz 1991; Zeisberg & Kalluri 2015; Lelongt & Ronco 2003)

Die Ausprägung und endokrine Funktion des Interstitiums, sowie der Anteil an zellulären und extrazellulären Komponenten variieren zwischen Kortex und Medulla; So nimmt das *renale Interstitium* im Kortex nur etwa 8 % des Gesamtvolumens ein; in der inneren Medulla hingegen inkludiert es bis zu 40 %. Das kortikale, renale Interstitium kann nochmals in ein peritubuläres Interstitium (dem Raum zwischen

Tubuli, Glomeruli und Kapillaren), ein periarterielles Gewebe (das lose Bindegewebe, welches die intrarenalen Arterien bzw. die lymphatischen Gefäße umgibt) und ein (extra)glomeruläres Mesangium (der extrazelluläre Raum zwischen den Mesangiumzellen des Glomerulus) untergliedert werden. In der Medulla entspricht die interstitielle Klassifizierung der anatomischen Struktur in eine Außen- und Innenzone. Der relative Volumenanteil in der äußeren Medulla entspricht in etwa der des kortikalen Interstitiums (Lemley & Kriz 1991; Zeisberg & Kalluri 2015).

Das interstitielle Gewebe beinhaltet Fibroblasten, lipidhaltige Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen und Perizyten, die alle in eine extrazelluläre Matrix eingelagert sind. Die Grundsubstanz dieser Matrix schließt, neben der interstitiellen Flüssigkeit und den Proteoglykanen, auch Glykosaminoglykane (v.a. Hyaluronan, Heparan- und Dermatan-sulfat) mit ein. Als fibrilläre Bestandteile treten vor allem Kollagene vom Typ I und III auf. Kollagene des Typs IV und V, sowie Laminin sind hauptsächlich in der *Basallamina* lokalisiert. Weitere Glykoproteine des renalen Interstitiums, deren Expression bei einer krankhaften Veränderung des Organs häufig erhöht ist, sind Fibronektin und Tenascin (Lemley & Kriz 1991; Furness 1996).

1.3.4 Zystennieren

Nierenerkrankungen können isoliert in der Niere (z.B. Tumore) oder als Folge einer systemischen Erkrankung (z.B. Nierenentzündung bei Diabetes) auftreten und die Funktion des Organs z.T. stark einschränken. Eine schwerwiegende, pathologische Veränderung der Niere, die häufig mit einer Niereninsuffizienz einhergeht, ist die Zystenniere (polyzystische Nierenerkrankung).

Polyzystische Nierenerkrankungen sind meist genetisch bedingt, wobei, je nach Art der Erkrankung, der Schweregrad der Symptome und der progressive Verlauf erheblich schwanken können. Man unterscheidet in diesem Zusammenhang zwischen der autosomal-dominanten polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD), der autosomal-rezessiven polyzystischen Nierenerkrankung (ARPKD), der Nephronophthise (NPH) und der medullär-zystischen Nierenerkrankung (MCKD) (Wilson 2004).

Die autosomal-dominant vererbte polyzystische Nierenerkrankung tritt mit einer Inzidenz von 1:400-1000 am häufigsten auf. Sie ist durch die Bildung zahlreicher renaler Zysten, die in beiden Nieren ausgeprägt sind, charakterisiert.

Ursache der Erkrankung ist eine Mutation im *PKD-1* bzw. *PKD-2* Gen, welche für Polycystin-1 (einem Membranrezeptor) bzw. Polycystin-2 (einem Kalziumkanal) kodieren. Neben der Niere zeigen häufig auch Leber, Pankreas und Darm zystische Veränderungen; zudem weisen Patienten mit ADPKD ein erhöhtes Risiko für die Bildung von Aneurysmen auf (Wilson 2004; Harris & Torres 2009).

Die autosomal-rezessiv vererbte polyzystische Nierenerkrankung tritt mit einer Inzidenz von 1:20000 deutlich seltener auf. Eine Mutation im Fibrozystin-Gen (*PKHD*) führt oft schon während der Fetalperiode oder unmittelbar nach der Geburt aufgrund einer pathologischen Vergrößerung der Nieren und einer damit beeinträchtigten Lungenreife (Lungenhypoplasie) zum Tode. Überlebende entwickeln eine Niereninsuffizienz und zeigen u.a. Anzeichen einer hepatischen Fibrose (Wilson 2004; Harris & Torres 2009).

Bei der Nephronophthise und medullär-zystischen Nierenerkrankung – beide werden aufgrund ihres ähnlichen Krankheitsbildes auch unter dem NPH-MCKD-Komplex zusammengefasst – sind die Zysten hauptsächlich an der Medulla-Kortex-Grenze lokalisiert. Im Gegensatz zu den beiden oben beschriebenen Erkrankungen (ADPKD, ARPKD) geht die zunehmende Nierenschädigung nicht mit einer renalen Volumenvergrößerung einher. Die Nephronophthise wird – je nach Eintreten des terminalen Nierenversagens – nochmals in die juvenile (ca. 13. Lebensjahr), infantile (vor dem 4. Lebensjahr) und adoleszente Form (ca. 19. Lebensjahr) unterteilt. Sie wird häufig durch eine Mutation im *NPHP1*, *NPHP2* bzw. *NPHP3* Gen ausgelöst und autosomal-rezessiv vererbt. Im Gegensatz dazu resultiert die medullär-zystische Nierenerkrankung, deren Ursache eine Mutation im *MCKD1* bzw. *MCKD2* Gen ist, erst im adulten Alter in eine Niereninsuffizienz. Das mutierte Gen wird in diesem Fall über einen autosomal-dominanten Erbgang an die Nachkommen weitergegeben (Hildebrandt & Otto 2000).

Interessanterweise kodieren nahezu alle Gene, deren Mutation mit der polyzystischen Nierenerkrankung in Verbindung gebracht werden, für Proteine des primären Ziliums. So konnten Polycystin-1 und Polycystin-2, sowie Fibrozystin im primären Zilium lokalisiert werden (Nauli et al. 2003; Bergmann et al. 2004). Nephrozystin, das *NPHP1* Genprodukt, scheint in fokale Adhäsionen und Adhärenzverbindungen involviert zu sein (Hildebrandt & Otto 2000).

1.3.5 Die Rolle von Fibronektin in der Niere

In der Niere wird Fibronektin nicht nur im Glomerulus, sondern auch in vaskulären Gefäßen, der Basalmembran tubulärer Epithelzellen und im peritubulären Interstitium exprimiert (Dixon et al. 1980). Innerhalb des Glomerulus ist das Protein v.a. in der mesangialen Matrix, der glomerulären Basalmembran und zwischen den glomerulären parietalen Epithelzellen und der Bowman-Kapsel lokalisiert (Dixon et al. 1980; Dixon & Burns 1982; Courtoy et al. 1980).

In vitro Studien postulierten, dass Fibronektin die Zellproliferation und –migration renaler Epithelzellen erhöht und die Tubulogenese positiv beeinflussen kann (Jiang et al. 2000). Ähnliche Resultate waren auch in isolierten Zellen der Ureterknospe zu beobachten (Ye et al. 2004). Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass Fibronektin eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Niere spielt.

Andererseits gehen Nierenerkrankungen häufig mit einer Akkumulation von Fibronektin im Glomerulus bzw. Interstitium einher (Dixon et al. 1980). So konnte zum Beispiel in Patienten mit einer diabetischen Nephropathie eine erhöhte Menge des Proteins in der mesangialen Matrix nachgewiesen werden (Mason & Wahab 2003). Überdies ist bei einer Fibrose der Anteil an Fibronektin im Interstitium ebenfalls erhöht (Furness 1996).

1.4 Zielsetzung

Als ubiquitär exprimiertes Glykoprotein der extrazellulären Matrix ist Fibronektin nicht nur in die Morphogenese zahlreicher Strukturen und Organe involviert, sondern spielt auch im adulten Organismus beim Aufbau von Geweben und der Aufrechterhaltung physiologischer Funktionen eine wichtige Rolle.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst der Einfluss von Fibronektin auf die postnatale Entwicklung des Trabekelwerks im Auge und der Niere untersucht werden. Hierzu wurde mit Hilfe des Tamoxifen-induzierbaren Cre / loxP-Systems eine ubiquitäre Defizienz von Fibronektin hervorgerufen. Konkret wurden die Versuchstiere (CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl}) ab dem postnatalen Tag 1 mehrmals täglich mit Tamoxifen-Augentropfen behandelt.

Hinsichtlich der Nachforschungen am Auge sollte ferner die Rolle des Glykoproteins beim trabekulären Kammerwasserabfluss bzw. bei der Aufrechterhaltung des

intraokulären Drucks analysiert werden. Zudem stellte sich die Frage, inwieweit eine Deletion von Fibronectin die Ausbildung eines primären Offenwinkelglaukoms (POWG) – ein Krankheitsbild, das häufig mit einer Akkumulation dieses Glykoproteins im Trabekelwerk einhergeht – beeinflusst. Um die Entwicklung eines Glaukoms zu induzieren, wurde das β B1-CTGF Mausmodell genutzt. Die Deletion von Fibronectin (β B1-CTGF / CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl}) erfolgte auch hier ab dem postnatalen Tag 1 über die Applikation von Augentropfen.

Im Hinblick auf die Entwicklung der Nachniere deuten *in vitro* Studien auf eine essentielle Rolle von Fibronectin während der Morphogenese des Sammelrohr- und Tubulussystems hin. Da diese Entwicklungsperiode in der Maus erst etwa eine Woche nach der Geburt abgeschlossen ist, sollten mögliche Folgen einer Fibronectin-Deletion in Abhängigkeit vom Induktionszeitpunkt untersucht werden.

Im Einzelnen wurden folgende Ziele verfolgt:

1. Die erfolgreiche Induktion einer postnatalen ubiquitären Deletion von Fibronectin mittels des Tamoxifen-abhängigen Cre / loxP-Systems
2. Die Untersuchung des Effekts einer postnatalen Fibronectin-Defizienz auf die trabekuläre Struktur und deren Physiologie
3. Die Untersuchung der Auswirkungen einer postnatalen Fibronectin-Defizienz auf den intraokulären Druck
4. Die Erforschung des Einflusses einer postnatalen Deletion von Fibronectin auf die Entwicklung eines POWG im β B1-CTGF Mausmodell
5. Die Untersuchung des Effekts einer postnatalen ubiquitären Deletion von Fibronectin auf die Morphologie und Physiologie der Niere in Abhängigkeit vom Induktionszeitpunkt

2. Material und Methoden

2.1 Materialliste

2.1.1 Materialien und Geräte

Tabelle 1: Liste der verwendeten Materialien und Geräte

Bezeichnung	Bezugsquelle
Agarose - Gelelektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Einbettautomat EM TP (Epon)	Leica, Wetzlar
Einbettautomat HMP110 (Paraffin)	Microm, Waldorf
Glaswaren	Schott (Mainz), Roth (Karlsruhe), VWR (Darmstadt)
Hamiltonspritze (25µl)	Roth, Karlsruhe
Heatsealer	4titude, Dorking, UK
Hera Safe Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau
IKA combimag RET Heizplatte	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
CFX Connect Real-time System	BioRad, München
Julabo SW20 Wasserbad	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Kern PLJ 2100-2M, Analysewaage	Kern&Sohn GmbH, Balingen
Kryo-Einfriergerät	Nunc, Roskilde, Dänemark
Küvetten	Schott, Mainz
Liquid Blocker PAP-Pen	SCI Science Services, München
Microm HM 500 OM Kryostat	Microm International, Walldorf
Mikroskop Axio Imager. Z1	Zeiss, Göttingen
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore Corporation, Billerica, USA
Model 45-101-i Class II Electrophoresis System	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
NanoDrop-2000c Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pipetman Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe Macroman TM	Gilson, Den Haag, Niederlande
Polymax 1040 Schüttler	Heidolph, Kelheim
Präparierbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Roller mixer SRT2 stuart®	Bibby Scientific Limited, Staffordshire , UK
Sunrise Basic ELISA-Reader	Tecan Austria GmbH, Grodig, Österreich
Supercut 2050 (Paraffin)	Reichert-Jung, Kirchseeon
Thermalcycler T100	BioRad, München
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator	Herolab Laborgeräte GmbH, Wiesloch
Ultracut E-Ultramikrotom (Epon)	Reichert-Jung, Kirchseeon
Vertikale Gelelektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Zentrifuge 5415D, 5415R, 5810R	Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Übersicht über die eingesetzten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
„Falcon“ Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nürnberg
3MM Blotting ("Whatman")-Filterpapiere	Neolab, Heidelberg
Deckgläser, 24 x 60mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Handschuhe Latex	Roth, Karlsruhe
Handschuhe Nitrile	VWR, Darmstadt
Küvetten	Schott, Mainz
Multi-Reaktionsgefäße 0,5ml; 1,5ml; 2 ml	Roth, Karlsruhe
Multidishes Nunclon™ Δ 24-well	Nunc, Roskilde, DEN
Ohrmarken	Hauptner & Heberholz, Solingen
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
PCR Plates, 96 well	Biorad, München
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
PVDF-Western Blot Membran	Roche, Mannheim
SuperFrost®Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig

2.1.3 Reagenzien

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Reagenzien

Bezeichnung	Bezugsquelle
10 x Q-Puffer	Qiagen, Hilden
5 x Puffer, coloured	Bioline, Luckenwalde
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO RotiGarose	Biozym Scientific, Oldendorf
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS), 10% (w/v)	Roth, Karlsruhe
Azeton	Merck, Darmstadt
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	Merck, Darmstadt
CDP-Star	Roche, Penzberg
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie®Brillant Blue R-250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DL-Dithiotreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
DMSO	Roth, Karlsruhe
Desoxy-Nukleotidtriphosphat (dNTPs)	Qiagen, Hilden
2-Dodeceny succinic-acid-anhydrid (DDSA)	Serva, Heidelberg
EDTA	Roth, Karlsruhe
Epon	Serva, Heidelberg
Ethanol 100%	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
GeneRuler® 100bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Glutaraldehyde, 25% in water	Serva, Heidelberg
Glycidether	Serva, Heidelberg

Guanidin HCl	Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin Gill 3	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Immobilon™ Western HRP Substrat	Millipore Corporation, Billerica, USA
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Ketamin	Wirtschaftsgenossenschaft Deutscher Tierärzte (WDT), Garbsen
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Maiskeimöl	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ (50 mM)	Qiagen, Hilden
MNA	Serva, Heidelberg
N, N, N', N',-Tetraethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Oligonukleotide (Primer)	Invitrogen, Karlsruhe
Osmiumtetroxid	Merck, Darmstadt
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Paraffin	Engelbrecht, München
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1,4-p-phenylendiamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protease-Inhibitor-Mix M	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
peqGold TriFast™	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pioloform	Plano, Marburg
Rotiphorese® Gel 30 (30% Acrylamidlg mit 0,8% Bisacrylamid 37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
SDS (sodium duodecyl sulfate)	Roth, Karlsruhe
Tamoxifen	Cayman Chemical, Michigan, USA
Taq DNA Polymerase	Bioline, Luckenwalde
Tissue-Tek	Sakura, Zoeterwoude, Netherlands
2,4,6-Tri(dimethylaminomethyl)Phenol (DPM-30)	Serva, Heidelberg
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
TRITC-konjugiertes Phalloidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Uranylacetat	Merck, Darmstadt
Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasser Rotisolv (Rnase-frei)	Roth, Karlsruhe
Weigert's Hämalaun	Roth, Karlsruhe
Xylazine	Serumwerk Bernburg, Bernburg
Xylol	Merck, Darmstadt

2.1.4 Enzymkits

Tabelle 4: Liste der eingesetzten Enzymkits

Bezeichnung	Bezugsquelle
qScript™ cDNA Synthesis Kit	Quanta, Gaithersburg, USA
FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)	Merck, Darmstadt

2.1.5 Oligonukleotidprimer

Tabelle 5: Genotypisierungsprimer

Primer	Spezies	Orientierung	Sequenz 5' nach 3'
CAGG-Cre	<i>Mus musculus</i>	fwd	atgcttctgtccgtttgccg
		rev	cctgttttgacggtcaccg
FN1 loxP2	<i>Mus musculus</i>	fwd	gccatgatctcacactgtagc
		rev	ttgccaactgacttggtgag
Beta B1	<i>Mus musculus</i>	fwd	ggaagtgccagctcatcagt
		rev	gtgcgggacagaaacctg
SV40	<i>Mus musculus</i>	fwd	gtgaaggaaaccttacttctgtggtg
		rev	gtccttgggggtcttctacctttctc
mT / mG	<i>Mus musculus</i>	fwd	ctctgctgcctcctggcttct
		rev_1	cgaggcggatcacaagcaata
		rev_2	tcaatgggcggggggtcggt

Tabelle 6: Auflistung der für die quantitative real-time RT-PCR verwendeten Primer

Primer	Spezies	Orientierung	Sequenz 5' nach 3'
GNB2L	<i>Mus musculus</i>	fwd	tctgcaagtacacggtccag
		rev	acgatgataggggtgctgct
Fibronectin	<i>Mus musculus</i>	fwd	gatgccgatcagaagtttg
		rev	ggttgtgcagatctcctcgt
Collagen 4a1	<i>Mus musculus</i>	fwd	ttaaaggactccagggaccac
		rev	cccactgagcctgtcacac
Elastin	<i>Mus musculus</i>	fwd	gctgctgctaaggctgctaa
		rev	agcacctgggagcctaactc
Fibrillin-1	<i>Mus musculus</i>	fwd	ggacggaaagaactgtgaagat
		rev	acacattccgttaggcaca
Collagen 1a1	<i>Mus musculus</i>	fwd	catgttcagctttgtggacct
		rev	gcagctgacttcagggatgt
Collagen 3a1	<i>Mus musculus</i>	fwd	tcccctggaatctgtgaatc
		rev	tgagtcgaattggggagaat
Integrin-β1	<i>Mus musculus</i>	fwd	tggcaacaatgaagctatcg
		rev	atgtcgggaccagtaggaca

2.1.6 Antikörper

Tabelle 7: Übersicht über die für Western Blot Analysen und Immunohistochemie eingesetzten Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Rabbit anti-Fibronectin, polyklonal	Dako, Hamburg
Rabbit anti-Fibronectin H300, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Goat anti-CD 31, polyklonal	R&D Systems, Wiesbaden
Rabbit anti-αSMA, polyklonal	Genetex, Kalifornien, USA
Mouse anti-Calbindin, monoklonal	Swant, Marly, Schweiz
Goat anti-Megalin, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Goat anti-Aquaporin-2, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Rabbit anti-PDGFR-β, polyklonal	Abcam, Cambridge, England
Rabbit anti-Laminin, polyklonal	Dako, Hamburg
Rabbit anti-Kollagen IV, polyklonal	Rockland, Pennsylvania, USA
Rabbit anti-E-Cadherin, monoklonal	Cell Signaling Technology, Cambridge, England
Cy™3 konjugiertes goat anti-rabbit	Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA
Cy™3 konjugiertes donkey anti-goat	Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA
AP-konjugiertes chicken anti-rabbit IgG	Cell Signaling Technology, Cambridge, England
HRP-konjugiertes rabbit anti-GAPDH	Cell Signaling Technology, Cambridge, England
Alexa Fluor® 488-konjugiertes goat-anti-mouse	Life Technologies, Paisley, England
Biotin-konjugiertes anti-goat	Vector Laboratories, Burlingame, USA

AlexaFluor® 488-konjugiertes Streptavidin	Life Technologies, Paisley, England
---	-------------------------------------

2.1.7 Zusammensetzung von Gelen, Lösungen und Puffer

Tabelle 8: Zusammensetzung der verwendeten Gele

Bezeichnung	Zusammensetzung
Agarosegel	1 g Agarose 100 ml 1x TBE 3 µl Ethidiumbromid
Sammelgel (SDS-Gel, 1 ml)	0,68 ml dH ₂ O 0,17 ml Rotiphorese® Gel 30 0,13 ml 1 M Tris/HCl (pH 6,8) 0,01 ml 10 % SDS 0,01 ml 10 % APS 0,001 ml TEMED
6 % Trenngel (SDS-Gel, 2,5 ml)	1,3 ml dH ₂ O 0,5 ml Rotiphorese® Gel 30 0,65 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) 0,025 ml 10 % SDS 0,025 ml 10 % APS 0,002 ml TEMED
10 % Trenngel (SDS-Gel, 2,5 ml)	0,95 ml dH ₂ O 0,85 ml Rotiphorese® Gel 30 0,65 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) 0,025 ml 10 % SDS 0,025 ml 10 % APS 0,001 ml TEMED

Tabelle 9: Rezepte für eingesetzte Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Proteinase K Lysepuffer (20mg/ml)	50 mM Kaliumchlorid 10 mM Tris-HCl, pH 8,3 2 mM Magnesiumchlorid 0,1 mg/ml Gelatine 0,45 % Nonidet P-40 0,45 % Tween 20 Proteinase K (500 µg/ml)
10x TBE	108 g Tris 55 g Borat 40 ml 0,5 M EDTA ad 1l mit dH ₂ O; pH 8
6x Loading-Dye	15 ml Glycerol 1 Spatelspitze OrangeG 35 µl H ₂ O
10 % SDS-Lösung	10g SDS ad 100 ml mit dH ₂ O
1,0 M Tris/HCl (pH 6,8)	121,14 g Tris ad 1 l mit dH ₂ O; pH 6,8
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	181,71 g Tris ad 1 l mit dH ₂ O; pH 8,8

SDS-Probenpuffer	0,25 M Tris/HCl (pH 6,8) 30 % Glycerin 8 % (w/v) SDS 0,02 % (w/v) Bromphenolblau 0,3 M DTT bzw. 10 % β -Mercaptoethanol
10x Elektrodenpuffer	250 mM Tris/HCl 400 mM Glycin 1% (w/v) SDS ad 1 l in dH ₂ O lösen
10x Transferpuffer	5,8 g Tris 2,9 g Glycin 200 ml Methanol 3,7 ml 10 % (w/v) SDS ad 1 l mit dH ₂ O
10x TBS	30 g Tris 80 g Natriumchlorid 2 g Kaliumchlorid mit HCl auf pH 7,4 (20 °C) einstellen ad 1 l mit dH ₂ O; autoklavieren
1x TBS-T	100 ml 10x TBS 0,05 % (v/v) Tween 20 ad 1l mit dH ₂ O
0,1 M Phosphatpuffer (PhP)	P1: Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O: 35,6 g auf 2 l P2: NaH ₂ PO ₄ x 1H ₂ O: 13,8 g auf 1 l P1:P2 = 5:1 pH 7,4
4 % Paraformaldehyd (PFA)	4 g PFA 100 ml PhP unter Rühren und Erwärmen lösen pH 7,4
Dissecting-Puffer	20,54 g Saccharose 0,34 g Imidazol 0,4 ml EDTA ad 200 ml mit dH ₂ O pH 7,2
1x PBS Otto	P1: K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O: 4,56 g + NaCl 16,36 g auf 1,5 l P2: KH ₂ PO ₄ : 0,68 g auf 500 ml P1 mit P2 auf pH 7,4 einstellen
Tris-EDTA	0,09 g EDTA 0,3 g Tris ad 250 ml mit dH ₂ O pH 8,5
Cacodylat-Puffer	20,14 g Cacodylatsäure auf 0,5 l dH ₂ O pH 7,2
EM-Fixans	2,5 % PFA, 2,5 % Glutaraldehyd in Cacodylat-Puffer
Stammlösung (Epon)	43,2 g Glycidether 16,8 g DDSA 30 g MNA
Stammlösung I (Richardson)	1 % Azur II: 5 g in 500 ml dH ₂ O

Stammlösung II (Richardson)	1 % Methylenblau: 5 g Methylenblau in 500 ml 1 % Borax
-----------------------------	--

2.2 *In vivo* Versuche

Alle in dieser Arbeit verwendeten Versuchstiere wurden unter standardisierten und artgerechten Bedingungen gehalten (Temperatur $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit, $55\% \pm 5\%$, Hell-Dunkel-Intervall 12 Stunden, Futter und Wasser *ad libitum*). Alle Tiere wurden im Einklang mit der „ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research“ behandelt. Die Tötung der Tiere erfolgte tierschutzgerecht mittels kurzzeitiger Isofluran-Betäubung und zervikaler Dislokation bzw. Ketamin/Xylazin Betäubung und anschließender Perfusion.

2.2.1 Transgene Mauslinien

2.2.1.1 Das Cre / loxP-Rekombinationssystem

Da eine konstitutive Defizienz von Fibronektin bereits während der frühen Embryonalphase zum Tode führt (George et al. 1993), wurde in der vorliegenden Arbeit das Cre / loxP-Rekombinationssystem genutzt, um Fibronektin gezielt nach der Geburt zu deletieren. Vereinfacht dargestellt sind für eine zeit- und/oder gewebespezifische Deletion anhand dieses Rekombinationssystem zwei Komponenten von großer Bedeutung: 1. Zwei loxP-Sequenzen, die den gewünschten Genabschnitt bzw. das gewünschte Gen flankieren und 2. eine Cre-Rekombinase, die die loxP-Sequenz erkennt, daran bindet und an der entsprechenden Stelle schneidet, was schließlich zur Deletion des flankierten DNA-Bereichs führt (Kos 2004).

2.2.1.2 Die mT/mG Reporterlinie

Um eine erfolgreiche Induktion der Cre-Rekombinase nachzuweisen, werden in der Regel sogenannte Reportermäuse eingesetzt. In dieser Studie wurde das *mT/mG* (*membrane-targeted tandem dimer tomato / membrane-targeted green fluorescent protein*) Mausmodell genutzt.

mT/mG Tiere exprimieren ubiquitär membrangebundenes Tomato, welches sich im Gewebe in einer roten Fluoreszenz widerspiegelt. Die mit der Aktivierung einer Cre-

Rekombinase einhergehende Exzision führt einerseits zum Verlust des roten Fluoreszenzsignals, andererseits zu einer Expression von membrangebundenem GFP (green fluorescent protein) (Muzumdar et al. 2007). Eine erfolgreiche Induktion der Cre-Rekombinase äußert sich demnach in einer grünen Fluoreszenz.

2.2.1.3 Fn^{fl/fl} Tiere

Für die konditionelle Deletion von *Fibronektin* wurden Tiere verwendet, bei denen die loxP-Stellen das Startkodon und Exon 1 des *Fibronektin*-Gens flankieren. Die Mäuse (Fn^{fl/fl}) wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. R. Fässler (MPI für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt.

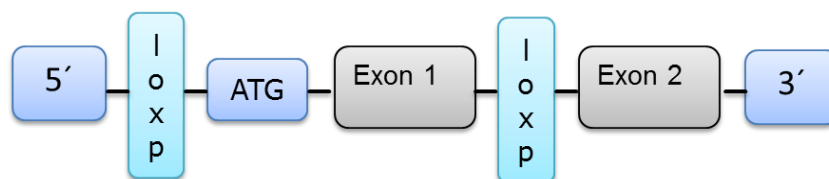


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Lokalisation der loxP-Stellen im Fibronektin Gen
Die loxP-Stellen flankieren das Startkodon (ATG) und Exon 1 des Fibronektin Gens.

2.2.1.4 Tamoxifen-induzierter, ubiquitärer Knock-out von Fibronektin

Für eine ubiquitäre Deletion von Fibronektin wurden Fn^{fl/fl} Mäuse mit Tieren verpaart, die eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase unter dem CAGG-Promotor exprimieren (CAGG-Cre-ERTM).

Hierbei ist die Cre-Rekombinase über ein Fusionsprotein an eine mutierte Form des Östrogen-Rezeptors gekoppelt, für den nicht 17 β -Östradiol, sondern 4-Hydroxy(OH)-Tamoxifen (TX) als Ligand fungiert. Diese Fusion führt unter physiologischen Bedingungen über eine Bindung an Hsp90 zu einer Sequestrierung der Cre-Rekombinase im Zytosol der Zelle. Eine Behandlung mit Tamoxifen resultiert in einer Lösung des Rekombinase-Rezeptor-Komplexes von Hsp90, sodass dieser in den Zellkern gelangen und dort das Rekombinationsereignis initiieren kann (Hayashi & McMahon 2002).

In der hier beschriebenen Studie wurde Tamoxifen mit einer Dosis von 2,5 mg / ml in Maiskeimöl gelöst und über Augentropfen verabreicht. Um eine möglichst effiziente Deletion zu gewährleisten, wurden die Tiere über mehrere Tage 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen behandelt (Schlecht et al. 2015). Der Nachweis einer

erfolgreichen Induktion erfolgte mit Hilfe von CAGG-Cre-ERTM / mT/mG Tieren (siehe 2.2.1.2).

2.2.1.5 Das β B1-CTGF Mausmodell

Um zu untersuchen, inwieweit eine postnatale Deletion von Fibronektin die Entwicklung eines primären Offenwinkelglaukoms beeinflussen kann, wurde das β B1-CTGF Mausmodell herangezogen. Diese Tiere zeichnen sich durch eine vermehrte Expression von CTGF unter Kontrolle des linsenspezifischen β B1-Crystallin Promotors aus und zeigen bereits nach dem ersten Lebensmonat typische Anzeichen eines POWG wie einen signifikant erhöhten IOD und einen damit einhergehenden Verlust von Axonen des Sehnervs. Darüber hinaus konnte in den CTGF-Überexpressionstieren ein erhöhter Level an Fibronektin im Trabekelwerk nachgewiesen werden (Junglas et al. 2012). In der hier vorliegenden Studie wurden β B1-CTGF Mäuse (CD 1), die uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Rudolf Fuchshofer zur Verfügung gestellt wurden, mit CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren (siehe 2.2.1.4) verpaart. Die Deletion von Fibronektin erfolgte – wie oben beschrieben – über eine Behandlung mit Tamoxifen-Augentropfen. Die Applikation erfolgte in diesem Teilprojekt von postnatalem Tag 1 bis 5 (2,5 mg / ml Tamoxifen gelöst in Maiskeimöl, 3x täglich).

2.2.2 Messung des intraokulären Druckes

Um zu überprüfen, inwieweit eine Deletion von Fibronektin den intraokulären Druck im gesunden bzw. glaukomatösen Auge beeinflusst, wurde dieser applanationstonometrisch ermittelt. Hierbei wird der Messkopf des Tonometers auf die Hornhaut aufgesetzt. Die Messung des Augeninnendrucks wird vom Tonometer automatisch durchgeführt und ist in der Regel nach ca. 30 Sekunden abgeschlossen. Bei einer einmaligen Messung des IOD erfolgte dies in tiefer allgemeiner Narkose (Ketamin / Xylazin) unmittelbar vor der Tötung der Tiere. Wurde der Augeninnendruck der Mäuse hingegen zu mehreren verschiedenen Zeitpunkten ermittelt (vgl. 3.3), wurden die Tiere lediglich kurzzeitig mit Isofluran betäubt.

2.2.3 Herzkammerperfusion

Um für die immunhistochemischen Untersuchungen einen optimalen Gewebeerhalt gewährleisten zu können, wurden die Tiere vor der Entnahme der Organe über ihre linke Herzkammer mit Fixans perfundiert.

Die Perfusion der Tiere erfolgte in tiefer allgemeiner Narkose (Ketamin/Xylazin). Durch Ausüben von Druckreizen auf Pfoten und Schwanz der Maus wurde die tiefe Anästhesie der Tiere überprüft und sichergestellt. Durch Eröffnen der Cavitas abdominalis, Lösen des Diaphragmas vom Rippenbogen und der lateralen Öffnung des Thorax zu beiden Seiten wurde das Herz freigelegt. Im Anschluss daran wurde eine Ecoflo Kanüle in den *Apex cordis* des linken Ventrikels eingeführt. Um das Ausfließen von Blut während der Perfusion sicherzustellen, wurde zusätzlich ein sogenannter „Entlastungsschnitt“ im rechten Atrium durchgeführt. Die Perfusion erfolgte zunächst mit ca. 6 ml einer heparinisierten Natrium-Chlorid-Lösung (1 ml Heparin auf 1 l NaCl (0,9 %)). Anschließend wurde das Gewebe mit Paraformaldehyd (4 %, ca. 6 ml) perfusionsfixiert.

2.2.4 Gewebepräparation

Im Anschluss an die Perfusion wurden – je nach Teilversuch - die Augen mitsamt Sehnerv, Niere, Leber, Herz, Lunge, Darm, Thymus, Milz, Pankreas, Haut, Gehirn und *Glandula submandibularis* möglichst gewebeschonend entnommen.

2.2.5 Präparation des korneoskleralen Rings

Für die Extraktion von RNA aus dem Trabekelwerk wurde der sogenannte Korneoskleralring – also der Bereich zwischen Kornea und Sclera, der die Ora serrata, das Trabekelwerk, sowie den Ziliarkörper miteinschließt – vom restlichen Auge freipräpariert. Hierzu wurde zunächst mit Hilfe von Feinpinzette und Federschere die Kornea zirkulär vom restlichen Augenbecher abgetrennt. Im Anschluss daran erfolgte die Präparation des Korneoskleralrings durch Entfernen des Augenbechers direkt hinter der Ora serrata.

Zur weiteren RNA-Isolation wurden die Korneoskleralringe beider Augen in Trifast™-Reagenz überführt und nach entsprechendem Protokoll aufgereinigt (siehe 2.4.1) bzw. bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.6 Präparation der Nieren

Für die Extraktion von RNA aus der Niere wurde diese vor der Perfusion der Tiere abgeschnürt und entfernt. Um Blutungen zu vermeiden, wurde zunächst mittels Nadel und Faden die Blutzufuhr über die *Arteria renalis* der entsprechenden Niere unterbrochen. Im Anschluss daran erfolgte die Entnahme der Niere. Zur weiteren RNA-Isolation wurde die Niere in Trifast™-Reagenz überführt und nach entsprechendem Protokoll aufgereinigt (siehe 2.4.1) bzw. bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Die Bestimmung des Genotyps erfolgte durch eine Polymerasekettenreaktion. Hierzu wurde den Mäusen - unter kurzzeitiger Anästhesie durch Isofluran - eine Ohrmarke gesetzt und anschließend die äußerste Schwanzspitze (ca. 0,5 cm) abgetrennt, welche dann in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen wurde.

2.3.1 DNA-Extraktion

Die Isolation der DNA aus der Gewebeprobe erfolgte durch Einsatz von Proteasen. Dabei wurde 1 ml Proteinase K Lysepuffer mit 25 µl Proteinase K versetzt. Den Gewebeproben wurden jeweils 200 µl dieser Mischung zugefügt und diese über Nacht bei 55°C und 850 rpm im Thermomixer inkubiert. Im Anschluss daran folgte die Inaktivierung der Proteinase K durch Erhitzen der Proben auf 95 °C für 10 min. Schließlich wurden die Proben für 10 min bei 13200 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

2.3.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein enzymabhängiges Verfahren und ermöglicht durch den Einsatz von spezifischen Primern die Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Fragments, das durch Gelelektrophorese nachgewiesen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Tiere - je nach Mauslinie – auf das Tragen der Fibronectin loxP-Sequenzen, der Cre-Rekombinase, des mT/mG-Konstrukts und des βB1-/SV40-Fragments getestet.

2.3.2.1 Fn^{fl/fl} Genotypisierung

Tabelle 10: Mastermix der Genotypisierungs-PCR für Fn^{fl/fl}

Mastermix	1x
Q-Puffer (10x)	1,5 µl
Glycerol (5x)	1,3 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,3 µl
dNTPs (10 mM)	0,3 µl
Primer FN loxP2 fwd (1:10)	0,3 µl
Primer FN loxP2 rev (1:10)	0,3 µl
H ₂ O	9,7 µl
Taq-Polymerase	0,3 µl
	14 µl Mastermix

Dem Mastermix wurde jeweils 1 µl der zu untersuchenden DNA (Template, unverdünnt) hinzugefügt. Die Reaktion erfolgte automatisiert in einem Thermocycler (Thermalcycler, Biorad, München) mit folgendem PCR-Programm:

Tabelle 11: PCR-Programm für die Genotypisierungs-PCR für Fn^{fl/fl}

Schritt	Temperatur	Dauer
1:Initialisierung	95°C	3 min
2:Denaturierung	94°C	30 sec
3:Hybridisierung	65°C	30 sec
4:Elongation	72°C	1 min
Schritt 2-4: 35x		
5:Finale Elongation	72°C	3 min
6:Halten	12°C	∞

Je nach Präsenz der LoxP-Sequenz zeigte sich in der Genotypisierungs-PCR ein Produkt unterschiedlicher Größe. Inkludierte das vervielfältigte Fragment eine LoxP-Sequenz, zeigte sich das Produkt auf einer Höhe von 486 bp. Ein Wildtyp-Allel hingegen resultierte in einer Größe von 452 bp. Heterozygote Tiere zeigten demnach beide Banden.

2.3.2.2 Genotypisierung für die Cre-Rekombinase

Tabelle 12: Mastermix der Genotypisierungs-PCR für die Cre-Rekombinase

Mastermix	1x
Puffer (5x)	3 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,3 µl
Primer Cre1 fwd (1:10)	0,3 µl
Primer Cre1 rev (1:10)	0,3 µl
H ₂ O	9,45 µl
Taq-Polymerase	0,15 µl
	14 µl Mastermix

Diesem Reaktionsansatz wurde jeweils 1 µl der zu untersuchenden DNA (Template, unverdünnt) zugesetzt. Die Reaktion erfolgte mit folgendem PCR-Programm:

Tabelle 13: PCR-Programm für die Genotypisierungs-PCR der Cre-Rekombinase

Schritt	Temperatur	Dauer
1.Initialisierung	95°C	3 min
2.Denaturierung	95°C	30 sec
3.Hybridisierung	61°C	30 sec
4.Elongation	72°C	35 sec
Schritt 2-4: 35x		
5.Finale Elongation	72°C	5 min
6.Halten	12°C	∞

Die Expression einer Cre-Rekombinase resultierte in einem Genotypisierungs-Produkt mit einer Größe von 270 bp.

2.3.2.3 mT/mG – Genotypisierung

Tabelle 14: Mastermix der Genotypisierungs-PCR für mT/mG

Mastermix	1x
Puffer (5x)	5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Primer 1 fwd (1:10)	0,5 µl
Primer 2 rev (1:10)	0,5 µl
Primer 3 rev (1:10)	0,5 µl
H ₂ O	16,45 µl
Taq-Polymerase (Mango)	0,3 µl
	14 µl Mastermix

Diesem Reaktionsansatz wurde jeweils 1 µl der zu untersuchenden DNA (Template, unverdünnt) zugesetzt. Die Reaktion erfolgte mit folgendem PCR-Programm:

Tabelle 15: PCR-Programm für die Genotypisierungs-PCR für mT/mG

Schritt	Temperatur	Dauer
1.Initialisierung	94°C	3 min
2.Denaturierung	94°C	30 sec
3.Hybridisierung	64°C	45 sec
4.Elongation	72°C	45 sec
Schritt 2-4: 35x		
5.Finale Elongation	72°C	5 min
6.Halten	12°C	∞

Für die transgenen Tiere zeigte sich ein Genotypisierungs-Produkt von 250 bp; Wildtypen zeigten ein Fragment mit einer Größe von 330bp.

2.3.2.4 βB1- / SV40- Genotypisierung

Tabelle 16: Mastermix der Genotypisierungs-PCR für βB1

Mastermix	1x
Q-Puffer (10x)	1,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,3 µl
Primer βB1 fwd (1:10)	0,3 µl
Primer βB1 rev (1:10)	0,3 µl
H ₂ O	11,25 µl
Taq-Polymerase	0,15 µl
	13,8 µl Mastermix

Dem Mastermix wurden jeweils 1,2 µl der zu untersuchenden DNA (Template, unverdünnt) hinzugefügt. Die Reaktion erfolgte nach folgendem PCR-Programm:

Tabelle 17: PCR-Programm für die Genotypisierungs-PCR von βB1

Schritt	Temperatur	Dauer
1.Initialisierung	96°C	2 min
2.Denaturierung	94°C	30 sec
3.Hybridisierung	65°C	30 sec
4.Elongation	72°C	20 sec
Schritt 2-4: 33x		
5.Finale Elongation	72°C	2 min
6.Halten	12°C	∞

Das Genotypisierungs-Produkt zeigte sich auf einer Höhe von 360 bp.

Tabelle 18: Mastermix der Genotypisierungs-PCR für SV40

Mastermix	1x
Q-Puffer (10x)	1,5 µl
Glycerol (5x)	3 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,15 µl
dNTPs (10 mM)	0,3 µl
Primer SV40 fwd (1:10)	0,3 µl
Primer SV40 rev (1:10)	0,3 µl
H ₂ O	7,3 µl
Taq-Polymerase	0,15 µl
	13 µl Mastermix

Diesem Reaktionsansatz wurden jeweils 2 µl der zu untersuchenden DNA (Template, unverdünnt) zugesetzt. Die Reaktion erfolgte nach folgendem PCR-Programm:

Tabelle 19: PCR-Programm für die Genotypisierungs-PCR von SV40

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initialisierung	94°C	2 min
2. Denaturierung	94°C	30 sec
3. Hybridisierung	55°C	30 sec
4. Elongation	72°C	45 sec
Schritt 2-4: 35x		
5. Finale Elongation	72°C	5 min
6. Halten	12°C	∞

Die Expression des SV40-Fragments resultierte in einem Genotypisierungs-Produkt mit einer Größe von 360 bp.

2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese erfolgte anschließend das Auftrennen der PCR-Amplifikate in einem 1,5 % Agarosegel mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Zur Herstellung des Gels wurde 1,5 g Agarose in 100 ml 1x TBE Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen der Lösung unter fließendem Wasser auf etwa 50 °C, wurden dieser 3 µl einer 0,01%-igen Ethidiumbromidlösung zugesetzt, in einen Gelschlitten gegossen, die Luftblasen entfernt und Plastikkämme eingesetzt um Geltaschen zu formen.

Nach Aushärten des Agarosegels wurden die Plastikkämme vorsichtig entfernt, der Kammerschlitten mitsamt Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit 1 x TBE Puffer aufgefüllt bis das Gel vollständig mit Flüssigkeit bedeckt war. Anschließend wurden jeweils 8 µl der Proben in die Geltaschen pipettiert. Um die

Größe der Fragmente abschätzen zu können, wurde zusätzlich eine Tasche des Gels mit 3 µl Molekulargewichtsmarker (GeneRuler® 100bp DNA Ladder, MBI Fermentas) befüllt.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 125 V für 40 min. Durch die Interkalation des im Agarosegel enthaltenen Ethidiumbromids in die DNA konnten die PCR-Banden transgener Proben mittels UV-Beleuchtung in einem Transilluminator sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

2.4 Expressionsanalyse mittels quantitativer real-time RT-PCR

Für den Nachweis der Deletion von Fibronectin hinsichtlich deren RNA-Expression, sowie damit einhergehenden Veränderungen im Expressionsniveau weiterer Bestandteile der extrazellulären Matrix bzw. entsprechender Rezeptoren wurde mittels quantitativer real-time RT-PCR eine Expressionsanalyse durchgeführt.

Bei der quantitativen real-time RT-PCR dient cDNA (*complementary DNA*), die durch reverse Transkription aus mRNA synthetisiert wird, als Matrize für die PCR-Reaktion. Durch Zusatz des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green I, der in doppelsträngige DNA interkaliert und dessen Fluoreszenz dabei detektiert wird, kann die Zunahme der PCR-Produkte während der Amplifikation untersucht werden. Dabei nimmt die Fluoreszenzintensität proportional zur Konzentration der cDNA zu. Derjenige Zyklus, bei dem die detektierte Fluoreszenz den Hintergrundwert überschreitet, wird als C_t (cycle threshold)-Wert bezeichnet. Je höher also der C_t -Wert ist, umso geringer war die Menge der eingesetzten cDNA und damit die Expression der ursprünglich vorhandenen mRNA. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens im Verhältnis zur Expression eines Referenzgens untersucht. Als Referenzgene werden häufig sogenannte Housekeeper eingesetzt, deren Expressionsrate sich nicht oder nur in geringem Maße verändert.

2.4.1 RNA-Isolation

Die Isolation der RNA aus Augen-, Nieren und Lebergewebe erfolgte mittels der einphasigen peqGold TriFastTM-Lösung. Dieses Reagenz aus Phenol und Guanin-Isothiocyanat führt zur Denaturierung der Zellkomponenten und dem Abstoppen der Enzymaktivität im entsprechenden Gewebe.

Die Extraktion wurde nach Anleitung des Herstellers wie folgt durchgeführt:

- 50 -100 mg Gewebe mit 1 ml TriFast™ homogenisieren
- 5 min bei RT inkubieren
- je 1 ml TriFast™ 200 µl Chloroform zugeben und stark durchmischen
- 3 -10 min bei RT inkubieren
- 5 min bei 12.000 x g zentrifugieren
- wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführen
- je 1 ml TriFast™ 500 µl Isopropanol zusetzen und stark durchmischen
- 10 min auf Eis inkubieren
- 10 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abnehmen
- Pellet 2x waschen: jeweils 1 ml 75 % Ethanol zugeben, stark durchmischen und 10 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugieren
- Überstand vollständig abnehmen, Pellet kurz trocknen lassen
- Pellet in 15 µl RNase-freiem H₂O (evtl. bei 55 – 60 °C) lösen
- RNA bei -20 °C lagern

2.4.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration der Proben wurde mit Hilfe des Spectrophotometers NanoDrop-2000c (peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen) bestimmt. Hierbei diente der Quotient aus der optischen Dichte bei $\lambda=260$ nm (Absorptionsmaximum von RNA) und $\lambda=280$ nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) als Indikator für die RNA-Reinheit. Die für die Analysen verwendeten RNA-Proben wiesen einen Wert zwischen 1,4 und 2,0 auf.

2.4.3 cDNA-Synthese

Für die Expressionsanalysen mittels quantitativer real-time RT-PCR wurde die RNA anschließend durch Einsatz einer reversen Transkriptase (RT) in cDNA (komplementäre, einzelsträngige DNA) umgeschrieben. Zur Synthese der cDNA wurde das qScript™ cDNA Synthesis Kit (Quanta BioSciences, Gaithersburg, USA) eingesetzt. Um mögliche DNA-Kontaminationen ausschließen zu können, wurden für jede Probe zwei Reaktionsansätze (+RT und -RT) pipettiert. Während sich der +RT-Ansatz aus der RNA-Probe, RNase-freiem Wasser und dem qScript-Mix (inkl. reverse Transkriptase) zusammensetzte, enthielt der -RT Ansatz neben der RNA-

Probe nur RNase-freies Wasser. Folglich muss jedes während der real-time RT-PCR amplifizierte Fragment im letztgenannten Ansatz als Verunreinigung angesehen werden.

Im Einzelnen wurden folgende Reaktionsansätze pipettiert:

Tabelle 20: Reaktionsansatz zur Synthese von cDNA

Reaktionsansatz	+RT	-RT
0,5 µg RNA + RNase-freies H ₂ O	7,5 µl	10 µl
5x qScript™ Reaction Mix	2,0 µl	
Reverse Transkriptase	0,5 µl	

Die reverse Transkription erfolgte im Thermalcycler T100 (Biorad, München) mit folgendem Programm:

Tabelle 21: PCR-Programm zur Synthese von cDNA

Schritt	Temperatur	Dauer
1	22°C	5 min
2	42°C	30 min
3	85°C	5 min
4	4°C	∞

Die synthetisierte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.4.4 Quantitative real-time RT-PCR

Die Analysen erfolgten unter Einsatz des CFX Connect™ Real-time System (BioRad, München). Es wurde – je nach Telexperiment - die Expression der Gene Fibronectin, Kollagen I, III und IV, Elastin, Fibrillin-1 und Integrin-β1 untersucht. Als Referenzgen zur Normalisierung fungierte GNB2L.

Der +RT-Ansatz wurde für jedes zu untersuchende Gen in dreifacher Ausführung pipettiert, während die -RT-Proben nur jeweils in Einzelansätzen untersucht wurden. Pro Primerpaar wurde zusätzlich eine Wasser-Kontrolle untersucht, um eine Verunreinigung durch Fremd-DNA auszuschließen.

Jede Probe wurde zunächst mit einer speziellen Mastermix Lösung (FastStart Universal SYBR Green Master (Rox), Roche) versetzt und zu jeweils 10 µl in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden je 5 µl des entsprechenden Primermix hinzugefügt, die Platte mit Hilfe einer speziellen Klebefolie (Microseal® „B“ Film, BioRad, München) und eines Heatsealers (4titude) nach oben hin abgedichtet, diese kurz zentrifugiert und schließlich in das Multicolor Realtime-PCR Detection

System eingesetzt. Nach Eingabe des entsprechenden Pipettierschemas und Auswahl der PCR-Parameter, wurde das PCR-Programm gestartet.

Tabelle 22: Mastermix-cDNA-Ansatz (1x) für die quantitative real-time RT-PCR

Mastermix	1x
Mastermix (Roche)	7,5 µl
cDNA	0,3 µl
RNAse-freies H ₂ O	2,35 µl

Tabelle 23: Primermix-Ansatz (1x) für die quantitative real-time RT-PCR

Primermix	1x
Primer fwd (1µM)	0,05 µl
Primer rev (1µM)	0,05 µl
RNAse-freies H ₂ O	4,90 µl

Tabelle 24: Programm für die quantitative real-time RT-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer
1 (1x)	95 °C	3 min
2 (50x)	95°C	10s
	60°C	1 min
3 (1x)	95°C	1 min
4 (1x)	55°C	1 min
5 (81x)	55°C + 0,5°C pro Zyklus (Schmelzkurve)	5s
6 (1x)	4°C	∞

Die Erhebung der Daten erfolgte mittels der CFX-Manager Software Version 3.1 (Biorad, München) und die Auswertung mit Hilfe dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2010. Die relative Expression der Transkripte wurde nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode bestimmt (Livak & Schmittgen, 2001).

2.5 Proteinbiochemische Methoden

Mittels Western Blot Analysen kann die Biosynthese verschiedener Proteine überprüft werden. Hierzu werden die Proteine zunächst mittels Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend auf eine Trägermembran übertragen. Der Nachweis des gewünschten Proteins erfolgt dann durch Einsatz entsprechender Antikörper. In der hier vorliegenden Arbeit wurden der Synthesellevel von Fibronektin im Korneoskleralring des Auges und der Niere untersucht.

2.5.1 Protein-Extraktion

Die Proteine wurden – je nach Gewebeart – auf unterschiedliche Art und Weise extrahiert. Während die Proteinextraktion aus dem Korneoskleralring unter Einsatz der Trizol-Methode erfolgte, wurde für die Proteinisolation aus der Niere das Nierengewebe mit Dissecting-Buffer versetzt.

2.5.1.1 Trizol-Methode

Für die Extraktion der Proteine nach der Trizol-Methode wurde zunächst nach oben genanntem Protokoll die RNA isoliert (siehe 2.4.1). Im Anschluss daran erfolgte nach Anleitung des Herstellers (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) die Isolation der Proteine aus der Phenol-Chloroform-Phase:

- 300 µl 100 % Ethanol zugeben und Reaktionsgefäß 2-3x invertieren
- 3 min bei RT inkubieren
- 15 min bei 2000 x g und 4 °C zentrifugieren
- Überstand in neues Reaktionsgefäß überführen und mit 1,5 ml Isopropanol versetzen
- 10 min bei RT inkubieren
- 10 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet 3x waschen: jeweils 2 ml 0,3 M Guanidinhydrochlorid (in 95 % Ethanol) zugeben, 20 min bei RT inkubieren und 5 min bei 7500 x g sowie 4 °C zentrifugieren
- Proteinpellet 1x waschen: 2 ml 100 % Ethanol zugeben, gut durchmischen, 20 min bei RT inkubieren und 5 min bei 7500 x g sowie 4 °C zentrifugieren
- Überstand quantitativ abnehmen und Pellet trocknen lassen
- Pellet in 200 µl 1 % SDS (versetzt mit 1:100 Protease-Inhibitor- und 1:100 Phosphatase-Inhibitor-Mix) aufnehmen und üN bei 50 °C inkubieren
- 10 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugieren
- Überstand in neues Reaktionsgefäß überführen
- Proteinlösung bei -20 °C lagern

2.5.1.2 Dissecting-Buffer

Für die Extraktion der Proteine mittels des Dissecting-Buffers wurden 20-150 mg Nierengewebe jeweils mit der zehnfachen Menge (in µl) an Puffer versetzt (inklusive

1:100 Protease-Inhibitor- und 1:100 Phosphatase-Inhibitor-Mix). Nach Homogenisierung des Gewebes im Puffer, wurde das Gemisch für 5 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinlösung bei -20 °C gelagert.

2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay

Die Konzentration der Proteine wurde mit Hilfe der BCA-Methode bestimmt. Hierbei reagieren Proteine unter alkalischer Umgebung mit Cu^{2+} und reduzieren dieses zu einwertigen Ionen. Das dadurch entstandene Cu^{1+} bildet mit der Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex. Der Farbumschlag ist proportional zur Menge des Proteins und kann durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 562 nm quantifiziert werden. Als Eichkurve diente eine Verdünnungsreihe aus BSA (bovines Serumalbumin). Hierfür wurde eine BSA-Stammlösung (2 mg/ml) mit 1 % SDS bzw. Dissecting-Buffer auf folgende Standardkonzentrationen verdünnt: 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 50, 25 µg/ml.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden jeweils 10 µl der einzelnen Verdünnungen des BSA-Standards (in Doppelansätzen), sowie der Proteinproben (unverdünnt, 1:5, 1:10) auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte aufgetragen und mit 200 µl BCA-Reagenz (Reagenz A:Reagenz B= 50:1) versetzt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde die Extinktion mit dem Sunrise-Basic ELISA-Reader (Tecan Austria GmbH, Grödig) gemessen. Die Proteinkonzentration ergab sich durch Abgleich mit der Eichgeraden und als Mittelwert der drei Ansätze.

2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem elektrischen Feld mit Hilfe der SDS-PAGE (Natriumduodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese), wobei eine vertikale Gelelektrophoresekammer verwendet wurde. Das SDS-Gel wurde zwischen zwei Glasplatten hergestellt. Da sich Fibronectin mit einem Molekulargewicht von 230-250 kDa erheblich von der Größe der Ladungskontrolle (GAPDH ca. 36 kDa) unterscheidet, kam ein zweiphasiges Trenngel zum Einsatz.

Hierzu wurde zunächst das 10 % Trenngel (siehe Tabelle 8) gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um die Bildung von Luftblasen im Übergangsbereich zwischen den Gelen zu vermeiden. Nach Aushärten des 10 % Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und auf dieselbe Art und Weise ein 6 % Trenngel (Tabelle 8)

hinzugefügt. Bei der Herstellung des Sammelgels (Tabelle 8) wurde darüber hinaus ein Plastikkamm eingesetzt, der - sobald das Sammelgel ebenfalls auspolymerisiert war - wieder entnommen werden konnte und somit Taschen zum Laden der Proteinproben freigab.

Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben (15-20 µg Protein) mit reduzierendem SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:6 versetzt und entweder für 5 min gekocht (bei Extraktion mittels der Trizol-Methode) oder lediglich für 15 min bei 37 °C erwärmt (bei Proteinisolation mittels Dissecting-Buffer).

Nachdem 1x Elektrodenpuffer in die Pufferkammer, d.h. der Gelelektrophoresekammer mit den SDS-Gelen, gegeben worden war, wurden die Proteinproben sowie 5 µl eines Proteinmolekulargewichtsmarkers (EZ Run Pre-stained Protein Ladder, Scientific Fisher) in die Geltaschen geladen. Die Auftrennung durch die Gelelektrophorese erfolgte bei 20 mA (pro Gel) für 75 min.

2.5.4 Western-Blot

Für Western-Blot Analysen wurden die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine zunächst auf eine PVDF-Membran transferiert und anschließend das gesuchte Protein mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen.

Der Transfer erfolgte mittels Semidry-Verfahren unter Einsatz einer Semi-Dry Transferkammer (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen). Hierzu musste die PVDF-Membran zunächst durch Methanol (1-2 s) aktiviert und anschließend in 1x Transferpuffer (ca. 5 min) äquilibriert werden. Ebenso wurden insgesamt 5 Stück Whatman-Filterpapiere in 1x Transferpuffer angefeuchtet.

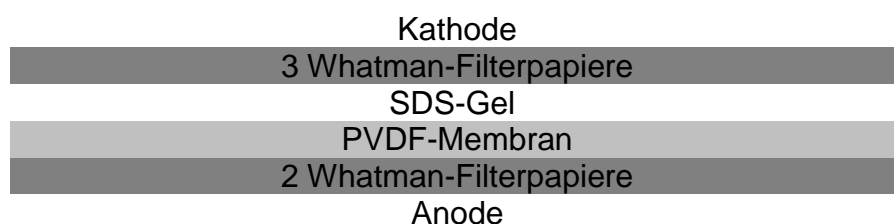


Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines Semidry-Blot

Der Proteintransfer fand bei 25 V für 90 min statt.

2.5.5 Nachweis spezifischer Proteine in Western-Blot Analysen

Der Nachweis spezifischer Proteine auf der PVDF-Membran erfolgte durch Einsatz von Primär- und Sekundärantikörpern. Die Primärantikörper sind hierbei gegen das gesuchte Antigen gerichtet, während die mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) bzw. Alkalische Phosphatase (AP) konjugierten Sekundärantikörper an den primären Antikörper binden und einen indirekten Nachweis der spezifischen Proteine ermöglichen. Der Menge des gesuchten Proteins in der Probe ist direkt proportional zur gemessenen Chemilumineszenz.

Um unspezifische Bindungen des primären Antikörpers zu vermeiden, wurde die PVDF-Membran unmittelbar nach dem Semidry-Blot über Nacht bei 4 °C in 5 % Magermilch geschwenkt. Anschließend wurde die Blockierlösung durch den Primärantikörper ersetzt und die Membran über Nacht bei 4° C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min in TBS-T erfolgte eine einstündige Inkubation der PVDF-Membran bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper. Daraufhin wurde die Membran nochmals 3 x 5 min mit TBS-T gewaschen. Für die Detektion über AP wurde die PVDF-Membran zunächst in Detektionspuffer geschwenkt (5 min); anschließend erfolgte – in Folie eingeschlagen - eine 5-minütige Inkubation mit dem CDP-Star Reagenz (ca. 1 ml; 1:100 in Detektionspuffer).

Das Chemilumineszenz-Signal wurde mit Hilfe der LAS 3000 Intelligent Dark Box (Fujifilm, Düsseldorf) detektiert. Für die Analyse und Quantifizierung wurde die Software *Aida Advanced Image Data Analyzer Version 4.06* (Raytest, Straubenhardt) verwendet.

Zur Normierung des Proteingehalts wurde das Enzym *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) herangezogen. Hierzu wurde die PVDF-Membran nach o.g. Detektion erneut 3 x 5 min mit TBS-T gewaschen und anschließend mit HRP-konjugiertem GAPDH über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach einem dreimaligen Waschschrift und einer 5-minütigen Inkubation in Immobilon™ Western HRP Substrat (ca. 1 ml), erfolgte die densitometrische Auswertung wie oben.

Tabelle 25: Kurzprotokolle für Fn und GAPDH Western-Blots

Protein	Blockierlösung	Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
Fibronektin	5 % MM	Rabbit anti-Fibronektin (Santa Cruz) 1:500 in 0,5 % MM	AP-konj. Chicken anti-rabbit 1:2000
GAPDH	-	HRP-konjugiertes rabbit anti-GAPDH 1:5000 in 0,5 % BSA	-

2.6 Histologische Arbeitstechniken

Für die histologische Untersuchung der Augen, Sehnerven, Nieren und anderer Organe anhand verschiedenster Färbeverfahren wurden sagittale bzw. tangential Gefrier-, Paraffin-, Semidünn- und / oder Ultradünnschnitte herangezogen.

2.6.1 Einbettung in Tissue-Tek und Herstellung von Gefrierschnitten

Für die Einbettung in Tissue-Tek wurden die enukleierten Augen bzw. entnommenen Nieren zunächst für 4 h in 4 % PFA immersionsfixiert und anschließend 3 x 10 min mit 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen. Zur Stabilisierung des Gewebes erfolgte anschließend eine Inkubation des Gewebes für jeweils 4 h in aufsteigenden Konzentrationen einer Saccharose-Lösung (10 %, 20 % bzw. 30 % (w/v) Saccharose in 0,1 M PhP). Schließlich konnten die Augen in Tissue-Tek eingebettet und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren werden. Nach Überführen der so entstandenen Blöcke in den Microm HM 500 OM Kryostat (Microm International, Walldorf) und deren Fixierung auf Metallblöcken, wurden sagittale Gefrierschnitte der Augen mit einer Dicke von 12 µm angefertigt, die dann auf einen SuperFrost®Plus Objektträger transferiert wurden. Die Blöcke wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.6.2 Einbettung in Paraffin und Herstellung von Paraffinschnitten

Für die Einbettung in Paraffin wurden die entsprechenden Organe zunächst für 4 h in 4 % PFA immersionsfixiert und danach 3 x 20 min mit 0,1 M Phosphatpuffer gespült. Die Einbettung in Einbettförmchen wurde mittels eines Einbettautomaten nach folgendem Schema gewährleistet:

Tabelle 26: Einbettschema für Paraffin-Schnitte

Reagenz	Dauer
Isopropanol 50 %	1h
Isopropanol 70 %	1h üN 1h
Isopropanol 80 %	1h
Isopropanol 96 %	1h 1h
Isopropanol 100 %	1h 1h 2h
Xylol 100 %	1h 1,5h

Paraffin 100 %	4h 8h
----------------	----------

Zur Ausbettung wurden die Organe aus den Einbettförmchen in Ausbettrahmen überführt und mit Paraffin (65 °C) überschichtet. Nach Aushärten des Paraffins auf einer Kälteplatte, wurden mit Hilfe des Supercut-Microtoms Sagittalschnitte mit einer Dicke von etwa 6 µm angefertigt und auf einen SuperFrost®Plus Objektträger transferiert.

Für die darauffolgenden histologischen bzw. immunhistochemischen Färbungen wurden die Sagittalschnitte wie folgt entparaffiniert und rehydriert:

- 2x 10 min Xylol
- 2x 10 min Isopropanol 100 %
- 2x 5 min Isopropanol 96 %
- 2x 5 min Isopropanol 80 %
- 1x 5 min Isopropanol 70 %
- 1x 5 min dH₂O

2.6.3 Einbettung in Epon und Herstellung von Semidünn- und Ultradünnschnitten

Für die Einbettung in Epon wurden Augen, Sehnerven und Nieren zunächst für 24 h in EM-Fixans immersionsfixiert und anschließend 4 x 20 min mit 0,1 M Na-Cacodylat-Puffer gespült. Nach einem weiteren Fixationsschritt in einer 1 % Osmiumferrocyanid-Lösung, wurde das Gewebe mehrmals in dH₂O gespült und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe (25 %, 35%, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, abs.) dehydriert.

Die Einbettung erfolgte mittels eines Einbettautomaten nach folgendem Schema:

Tabelle 27: Einbettschema für Epon-Schnitte

Reagenzgemisch	Dauer
Azeton	2 x 20 min
Azeton / Epon 3:1	2h
Aceton / Epon 1:1	2h
Azeton / Epon 1:3	2h
Epon	ün

Für die Ausbettung wurde die Stammlösung inklusive eines Beschleunigers (1,5 ml DMP-30) verwendet.

Das Aushärten in frischem Epon wurde durch eine Inkubation der Proben bei 30 °C für 2 h und anschließend bei 60 °C für 48 h gewährleistet.

Mit Hilfe eines Ultracut-E-Ultramikrotoms wurden Semidünnschnitte mit einer Dicke von etwa 1 µm hergestellt. Für eine genauere Betrachtung der Zystenregion in der Niere wurden zudem Serienschritte generiert. Hierzu wurden mehrere, nacheinanderfolgende Schnitte auf einen Objektträger aufgenommen.

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden von ausgewählten Regionen des Auges (juxtakanalikuläre Region) bzw. der Nieren mittels eines Ultracut-E-Ultramikrotoms Ultradünnschnitte mit einer Dicke von etwa 60 nm angefertigt. Diese wurden auf Kupfergrids bzw. mit Pioloform überzogenen Slotgrids aufgefangen und – unter Lichtausschluss – mit 10 % Uranylacetat (10 min) und 5 % Bleicitrat (10 min) kontrastiert.

2.6.4 Histologische Färbeverfahren

2.6.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) ist ein typisches Färbeverfahren zur morphologischen Untersuchung von Zell- und Gewebestrukturen. Hierbei lagert sich das Hämatoxylin an die sauren / basophilen Bestandteile der Zelle (DNA, Ribosomen, raues endoplasmatisches Retikulum) an und färbt diese blau. Die Gegenfärbung der basischen / eosinophilen Zellkomponenten (Zytoplasma, Mitochondrien, glattes endoplasmatisches Retikulum, Kollagen) erfolgt mit Eosin in einer charakteristischen Rotfärbung.

Die Färbung wurde an Paraffinschnitten nach folgendem Schema durchgeführt:

- Schnitte entparaffinieren und rehydrieren
- 1 min in „Hämatoxylin Gill 3“ färben
- 15 min mit Leitungswasser fließend wässern
- 5 min dH₂O
- 25-30 s in Eosin (0,5 %) färben
- 5 min dH₂O
- 5 min Isopropanol 70 %
- 5 min Isopropanol 80 %
- 5 min Isopropanol 96 %
- 2x 5 min Isopropanol 100 %

- 2x 5 min Xylol
- Eindeckeln mit Depex

Die gefärbten Schnitte wurden bis zur lichtmikroskopischen Untersuchung bei Raumtemperatur gelagert.

2.6.4.2 Pikro-Siriusrot-Färbung

Die Pikro-Siriusrot-Färbung ist ein Färbeverfahren, das häufig zur Untersuchung von destrukturiertem Gewebe – z.B. bei Auftreten einer Fibrose – eingesetzt wird. Hierbei bindet der saure, hydrophile Siriusrot-Farbstoff an die basischen Gruppen der Kollagenfasern des Typs I und III. Kollagen erscheint in der lichtmikroskopischen Untersuchung rot, während das Zytoplasma gelb angefärbt ist.

Die Picrosirius-Rot-Färbung erfolgte an Paraffinschnitten der Niere nach folgendem Schema:

- Schnitte entparaffinieren und rehydrieren
- 8 min in „Weigert`s Hämalun“ färben
- 10 min mit Leitungswasser fließend wässern
- 1 h in Pikro-Siriusrot färben
- 2x 5 min 0,5 % Essigsäure
- 3x 5 min Isopropanol 100 %
- 2x 5 min Xylol
- Eindeckeln mit Depex

Die gefärbten Schnitte wurden bis zur lichtmikroskopischen Untersuchung bei Raumtemperatur gelagert.

2.6.4.3 Färbung nach Richardson

In der vorliegenden Arbeit wurden - mittels einer Färbung nach Richardson - Semidünnschnitte des Kammerwinkels und der Niere bzw. Serienschnitte einer Zystenregion in der Niere lichtmikroskopisch näher untersucht.

Hierfür wurden die Semidünnschnitte 15-30 s bei 60 °C mit der Richardson Färbelösung (1 Teil Stammlösung I + 1 Teil Stammlösung II + 2 Teile dH₂O) inkubiert und anschließend gründlich mit dH₂O gespült.

2.6.4.4 Kontrastierung der Nervi optici mit Paraphenyldiamin (PPD)

Für die Beurteilung der Auswirkungen einer Fibronectin-Deletion auf die Gesamtanzahl der Sehnervaxone im gesunden bzw. glaukomatösen Auge wurden Semidünnschnitte der *Nervi optici* mittels einer Paraphenyldiamin-Färbung nach folgendem Protokoll kontrastiert:

- 500 mg Paraphenyldiamin in 50 ml Ethanol (absolut) lösen
- Paraphenyldiaminlösung drei Tage bei Tageslicht oxidieren
- Semidünnschnitte 30 min bei RT färben
- Schnitte mit Ethanol (absolut) spülen
- Trocknen und eindeckeln

2.6.4.5 Immunhistochemische Färbeverfahren

Immunhistochemische Färbungen ermöglichen die spezifische Lokalisation von Proteinen in Geweben und Zellen. Der Nachweis erfolgte hierbei durch indirekte Immunfluoreszenz, d.h. durch den Einsatz von Primär- und Sekundärantikörpern. Während sich der primäre Antikörper an das gesuchte Antigen anlagert, bindet der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper an ein Epitop des Primärantikörpers. Der Einsatz eines biotinylierten Sekundärantikörpers und Alexa 488 / 546-konjugiertem Streptavidin bewirkt zudem eine Verstärkung schwacher Fluoreszenzsignale.

Zur Markierung der Zellkerne wurde der Fluoreszenzfarbstoff DAPI eingesetzt, der in die DNA interkaliert und mit Licht einer Wellenlänge von 381 nm angeregt wird.

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden – je nach Protein und Antikörper – Gefrier- oder Paraffinschnitte von Augen, Nieren und Leber verwendet.

Mit Gefrierschnitten wurde – nach einem 10-minütigen Waschschrift in 0,1 M Phosphatpuffer - wie folgt verfahren:

- Areal um die Schnitte mit Hilfe eines Liquid Blocker PAP-Pens begrenzen
- Schnitte 1 h bei RT blockieren
- Inkubation des Primärantikörpers ü.N. bei 4 °C
- Schnitte 3x 5 min mit Waschpuffer spülen
- Inkubation des Sekundärantikörpers für 1 h bei RT
- Schnitte 3x 5 min mit Waschpuffer spülen
- Eindeckeln mit DAPI-haltigem Eindeckmedium

Die Antikörper wurden jeweils in einer 1:10 Verdünnung der entsprechenden Blockierlösung aufgenommen.

Zur Verstärkung des Fluoreszenzsignals mittels Biotinylierung erfolgten nach der Inkubation des Biotin-konjugierten Sekundärantikörpers drei weitere Waschschrte und eine zusätzliche Inkubation der Schnitte mit Alexa-488 konjugiertem Streptavidin (1 h bei RT).

Paraffinschnitte wurden - wie in 2.6.2 beschrieben - zunächst entparaffiniert und rehydriert. Um eine Bindung des primären Antikörpers zu bewerkstelligen, war z.T. eine Vorbehandlung der Schnitte notwendig.

Die Vorbehandlung mit Tris-HCl und Proteinase K (Kollagen IV, Laminin) erfolgte nach folgendem Schema:

- 5 min Tris-HCl (0,05 M)
- 5 min Proteinase K (1:57) in 0,05 M Tris-HCl
- 5 min dH₂O
- 30 min HCl (2 M)
- 5 min dH₂O

Für die immunhistochemischen Färbungen gegen Calbindin, Megalin und Aquaporin-2, wurden die Schnitte zunächst für 40 Minuten bei 100 °C in Tris-EDTA erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung (ca. 15 min bei RT), erfolgten drei Waschschrte von jeweils 5 min in Waschpuffer.

Das darauffolgende Färbeprozedere entsprach dem der oben beschriebenen Gefrierschnitte.

Die fluoreszenzgefärbten Gefrier- und Paraffinschnitte wurden bis zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung bei 4 °C aufbewahrt.

Tabelle 28: Kurzprotokolle zu den immunhistochemischen Färbungen

Primärer AK	Einbett-medium	Vorbehandlung	Blockier-lösung	Waschpuffer	Sekundärer AK
Rabbit anti-Fibronektin (DAKO) 1: 500	Tissue-Tek	keine	3 % BSA in 0,1 M Php	0,1 M Php	Goat anti-rabbit Cy3-konjugiert 1:2500
Goat anti-CD 31 1:100	Tissue-Tek	keine	2 % BSA, 0,2 % CWFG, 0,1 %	0,1 M Php	anti-goat Biotin-konjugiert 1:500,

			Triton in 0,1 M Php		Alexa Fluor® 488- konjugiertes Streptavidin 1:1000
Rabbit anti- αSMA , 1:200	Paraffin	keine	2 % BSA, 0,2 % CWFG, 0,1 % Triton in 0,1 M Php	0,1 M Php	Goat anti- rabbit Cy3- konjugiert 1:2500
Rabbit anti- Kollagen IV 1:200	Paraffin	Tris-HCl + Proteinase K	2 % BSA in 0,1 M Php	0,1 M Php	Goat anti- rabbit Cy3- konjugiert 1:2500
Mouse anti- Calbindin 1:400	Paraffin	40 min kochen in Tris-EDTA	1 % BSA in PBS (Otto)	PBS (Otto)	goat-anti- mouse Alexa Fluor® 488- konjugiert
Goat anti- Megalin 1:200	Paraffin	40 min kochen in Tris-EDTA	1 % BSA in PBS (Otto)	PBS (Otto)	Donkey anti-goat Cy3- konjugiert 1:2500
Goat anti- Aquaporin-2 1:200	Paraffin	40 min kochen in Tris-EDTA	1 % BSA in PBS (Otto)	PBS (Otto)	anti-goat Cy3- konjugiert
Rabbit anti- PDGFR-β 1:200	Paraffin	keine	1 % BSA in PBS (Otto)	PBS (Otto)	Goat anti- rabbit Cy3- konjugiert 1:2500
Rabbit anti- Laminin 1:200	Paraffin	Tris-HCl + Proteinase K	3 % BSA in 0,1 M Php	0,1 M Php	Goat anti- rabbit Cy3- konjugiert 1:2500

2.6.4.6 Phalloidin-Färbung

Die Färbung des filamentösen Aktin (F-Aktin) erfolgte über eine Inkubation von Gefrierschnitten mit TRITC-konjugiertem Phalloidin. Hierfür wurden Gefrierschnitte mit einer 1:1000-Verdünnung des fluoreszenzmarkierten Toxins (in 0,1 M Php) für 1 h bei RT inkubiert.

2.6.5 Mikroskopie

Die Analyse der Gefrier-, Paraffin- und Semidünnschnitte erfolgte anhand des Axio Imager. Z1 (Carl Zeiss, Jena) Mikroskops. Für die Analyse der immunhistochemischen Färbungen kam darüber hinaus das ApoTome Zusatzmodul (Carl Zeiss, Jena) zum Einsatz. Die Aufnahme und Verarbeitung der

mikroskopischen Bilder erfolgte mit der Bildanalyse-Software ZEN 2.3 (Carl Zeiss, Jena).

Ultradünnschnitte wurden unter Einsatz eines Transmissions-Elektronenmikroskops (Zeiss EM 10) untersucht und dokumentiert (Zeiss, Oberkochen).

Für die Auszählung der Sehnervaxone, wurden die kontrastierten Semidünnschnitte in einer 100x Vergrößerung lichtmikroskopisch abgelichtet. Pro Sehnerv wurde - mit Hilfe des „Count-Tool“ des Programms *Adobe Photoshop*- jeweils die Axonanzahl in 5 verschiedenen quadratischen Feldern (50 x 50 µm) ermittelt. Das Ausmessen des Sehnervenfläche erfolgte anhand der Bildanalyse-Software ZEN 2.3.

Die Gesamtanzahl der Sehnervaxone ergab sich dann aus folgender Formel:

Gesamtanzahl der Sehnervaxone = (Axonfläche (in µm²) / 12500 µm²) x Summe der Axone (in den 5 ausgezählten Feldern).

Zur Quantifizierung des Gehalts an extrazellulärer Matrix im subendothelialen Bereich des Schlemm -Kanals wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen in einer 31 500 x Vergrößerung aufgenommen. Anhand der *Image J* Software wurde von jeweils fünf randomisiert ausgewählten Aufnahmen (pro Auge) der prozentuale Anteil an matrix-freier Fläche ermittelt. Als „matrix-frei“ wurde diejenige Fläche definiert, die einen Grauwertanteil von 200 (8 bit Format) nicht unterschreitet.

2.7 Proteomics-Analysen

Eine Proteomanalyse ermöglicht die Messung der tatsächlich vorhandenen Menge aller exprimierten Proteine inklusive deren posttranslationaler Modifikationen.

Für die Untersuchung des Nierengewebes wurde das Gesamtproteom mittels der SWATH-Technik, also basierend auf LC-MS, analysiert.

Die Untersuchungen wurden freundlicherweise vom *Institut für funktionelle Genomik* (Biopark Regensburg, Prof. Dr. Peter Oefner, sowie Prof. Dr. Wolfram Gronwald) durchgeführt.

2.8 Untersuchungen des Urins

Um die Funktion der Nieren zu überprüfen, wurde der Urin von Fn^{fl/fl} und CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren bezüglich des Albumin-, Natrium- und Kaliumspiegels, sowie der Osmolalität untersucht.

Hierbei wurde die Albumin- und Kreatininmenge mittels ELISA bestimmt. Der Natrium- bzw. Kaliumspiegel wurde anhand eines Flammenphotometers und die Osmolalität mit Hilfe eines Osmometers ermittelt.

Die Untersuchungen wurden freundlicherweise vom *Institut für Physiologie* (Universität Regensburg, Prof. Dr. Frank Schweda) durchgeführt.

2.9 Auswertung und Statistik

Alle Daten wurden unter Verwendung des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft® Excel 2010 (Microsoft® Corporation, Redmond, USA) ausgewertet. Bei der statistischen Analyse zweier Stichproben kam der Student'sche t-Test zum Einsatz; bei der Analyse mehrerer Stichproben die ein- bzw. mehrfaktorielle ANOVA. Statistische Unterschiede wurden für $p < 0,05$ (*) als signifikant, für $p < 0,01$ (**) als hoch signifikant und für $p < 0,005$ (***) bzw. $p < 0,001$ (****) als höchst signifikant angenommen. Diagramme wurden zunächst mit Microsoft® Excel 2010 (Microsoft® Corporation, Redmond, USA) erstellt und anschließend in CorelDRAW® X4 (Corel® Corporation, Ottawa, CAN) in Vektorgrafiken umgearbeitet.

3. Ergebnisse

Da eine generelle Defizienz von Fibronektin bereits im frühen Embryonalstadium zum Tode führt (George et al. 1993), wurde in nachfolgenden Experimenten das Glykoprotein postnatal mit Hilfe des Tamoxifen-induzierbaren Cre / loxP-Systems deletiert. Hierzu wurden Tiere, deren Fibronektin-Gen mit loxP-Sequenzen flankiert ist (Fn^{fl/fl}), mit Mäusen gekreuzt, die eine Tamoxifen-abhängige, ubiquitär aktive Cre-Rekombinase unter Kontrolle des CAGG-Promotors exprimieren (CAGG-Cre-ERTM). Eine erfolgreiche Induktion führt in diesem Fall zu einer Exzision des Startkodons und Exon 1 des Fibronektin-Gens.

Primäres Ziel der hier vorliegenden Studie war es, die Rolle des Glykoproteins beim trabekulären Kammerwasserabfluss zu ermitteln. Um eine möglichst effiziente Deletion im Trabekelwerk zu gewährleisten, wurde die Cre-Rekombinase durch die Applikation von Tamoxifen über Augentropfen aktiviert (Schlecht et al. 2015).

Da im Rahmen dieser Untersuchungen auch Veränderungen in der Niere beobachtet werden konnten, wurde zudem eine Analyse der renalen Anomalien in die Arbeit mit eingeschlossen.

3.1 Die Behandlung mit Tamoxifen-Augentropfen resultiert in einer ubiquitären Aktivierung des Cre/loxP-Systems

Anhand der *mT/mG* (*membrane-targeted dimer tomato / membrane-targeted GFP*) Reportermauslinie wurde zunächst eine erfolgreiche Induktion der Cre-Rekombinase mittels Tamoxifen-Augentropfen nachgewiesen. *mT/mG* Tiere exprimieren ubiquitär membrangebundenes tdTomato, das sich im Gewebe in einer roten Fluoreszenz widerspiegelt. Die mit der Aktivierung einer Cre-Rekombinase einhergehende Exzision führt einerseits zum Verlust des roten Fluoreszenzsignals, andererseits zu einer Expression von membrangebundenem EGFP (green fluorescent protein). Eine erfolgreiche Induktion der Cre-Rekombinase äußert sich demnach in einer grünen Fluoreszenz (Muzumdar et al. 2007)

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden Tiere der Reporterlinie mit CAGG-Cre-ERTM Mäusen gekreuzt. Die Versuchstiere wurden von postnatalem Tag 1 bis 5

3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg/ml) behandelt und das isolierte Gewebe im Alter von 5-6 Wochen auf ihr Fluoreszenzsignal hin überprüft. Als Kontrollgruppe fungierten in diesem Fall Geschwistertiere, die ebenfalls mit Tamoxifen behandelt wurden, jedoch keine Cre-Rekombinase exprimierten.

Im Folgenden sind exemplarisch der Kammerwinkel des Auges, Niere und Leber von Kontroll- und CAGG-Cre-ERTM / mT/mG Tieren dargestellt.

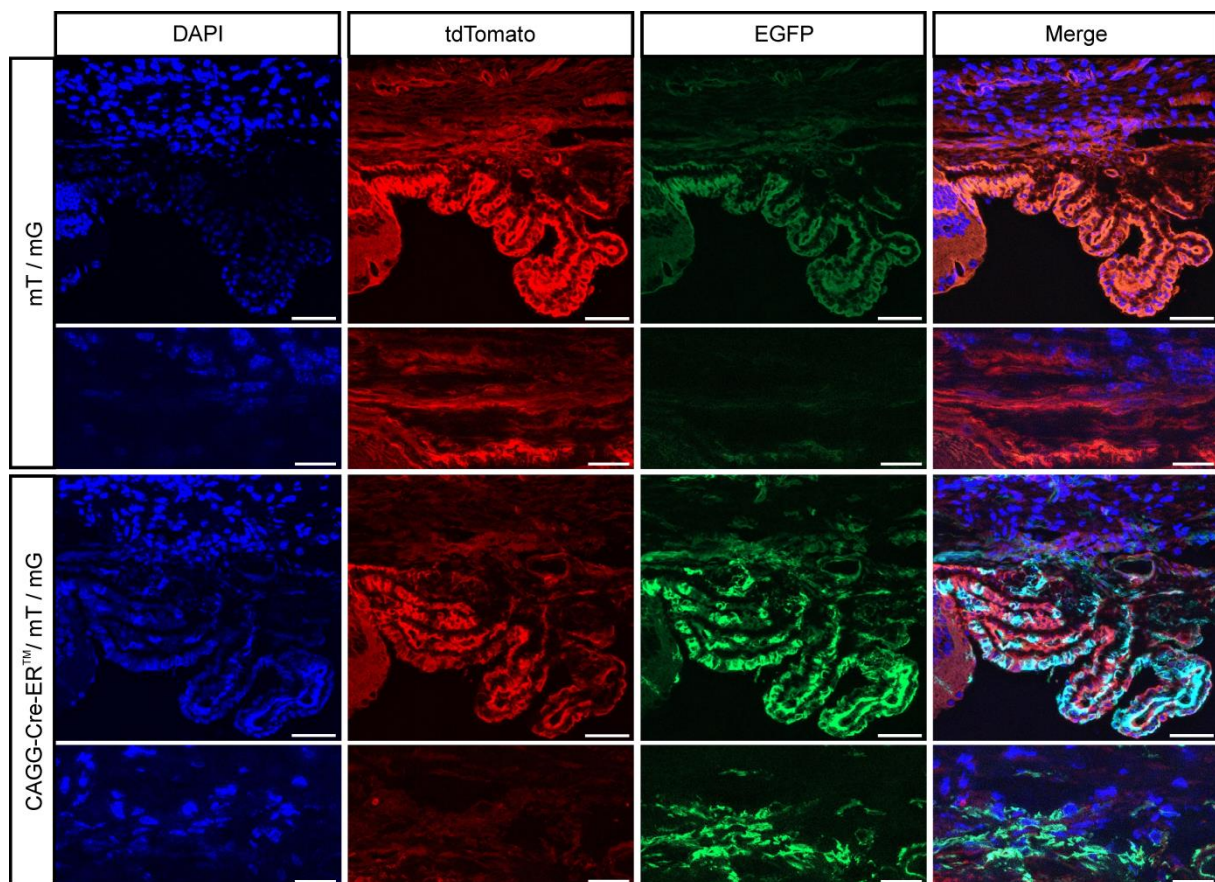


Abbildung 9: Expression von tdTomato und EGFP im Kammerwinkel von CAGG-Cre-ERTM / mT/mG Tieren nach Applikation von Tamoxifen mittels Augentropfen

Für die Induktion wurden die Versuchstiere von P 1 bis P 5 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten im Alter von 5-6 Wochen. Im oberen Panel ist jeweils der Kammerwinkel, im unteren Panel ein vergrößerter Ausschnitt des Trabekelwerks dargestellt. Fluoreszenzmikroskopische Analysen von Sagittalschnitten des Auges zeigten im Trabekelwerk von CAGG-Cre-ERTM / mT/mG Mäusen eine spezifische GFP-Färbung an; im Kontrolltier war keine Expression von GFP erkennbar. Maßstabsbalken: oben 50 µm, unten 20 µm

Fluoreszenzbasierte Untersuchungen an Sagittalschnitten ließen im Auge der CAGG-Cre-ERTM / mT/mG Tiere ein spezifisches EGFP-Signal erkennen. Im vorderen Augenabschnitt war insbesondere im Trabekelwerk ein grünes Fluoreszenzsignal nachweisbar. Das Ziliarepithel zeigte nur zum Teil eine Expression von EGFP (Abb. 9).

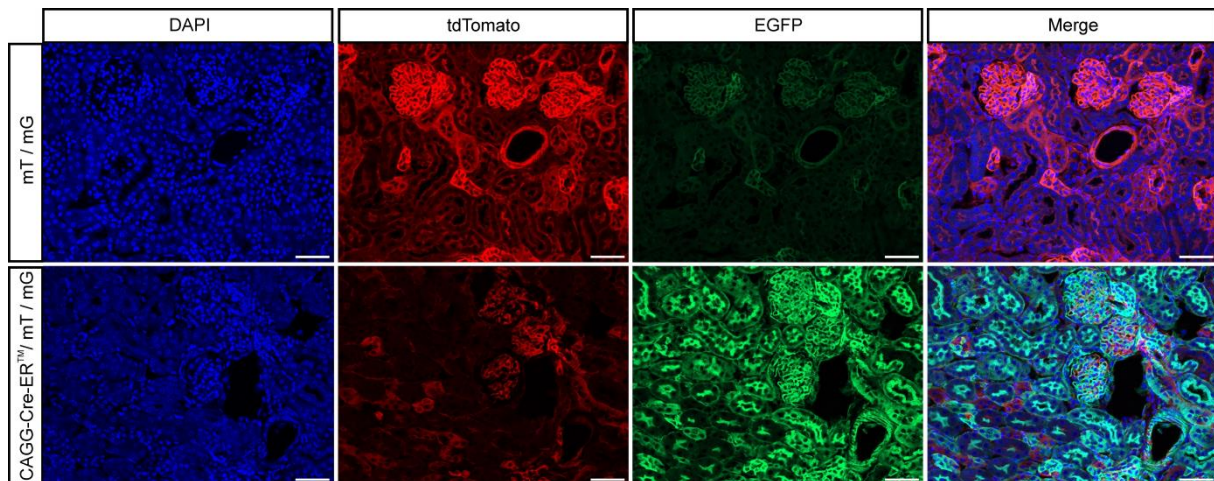


Abbildung 10: Expression von tdTomato und EGFP in der Niere von CAGG-Cre-ERTM / mT/mG Tieren nach Applikation von Tamoxifen mittels Augentropfen

Für die Induktion wurden die Versuchstiere von P 1 bis P 5 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg/ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten im Alter von 5-6 Wochen. Fluoreszenzmikroskopische Analysen von Sagittalschnitten der Niere ließen in CAGG-Cre-ERTM / mT/mG Tieren eine spezifische GFP-Färbung in den Glomeruli, Tubuli und Blutgefäßen erkennen; in mT/mG Mäusen war kein entsprechendes Signal nachweisbar. Maßstabsbalken: 50 µm

Eine fluoreszenzmikroskopische Betrachtung von Sagittalschnitten der Niere zeigte in CAGG-Cre-ERTM / mT/mG Tieren ein spezifisches EGFP-Signal in den Glomeruli, Tubuli und Blutgefäßen an. In den Kontrolltieren war keine Expression von EGFP nachweisbar (Abb. 10).

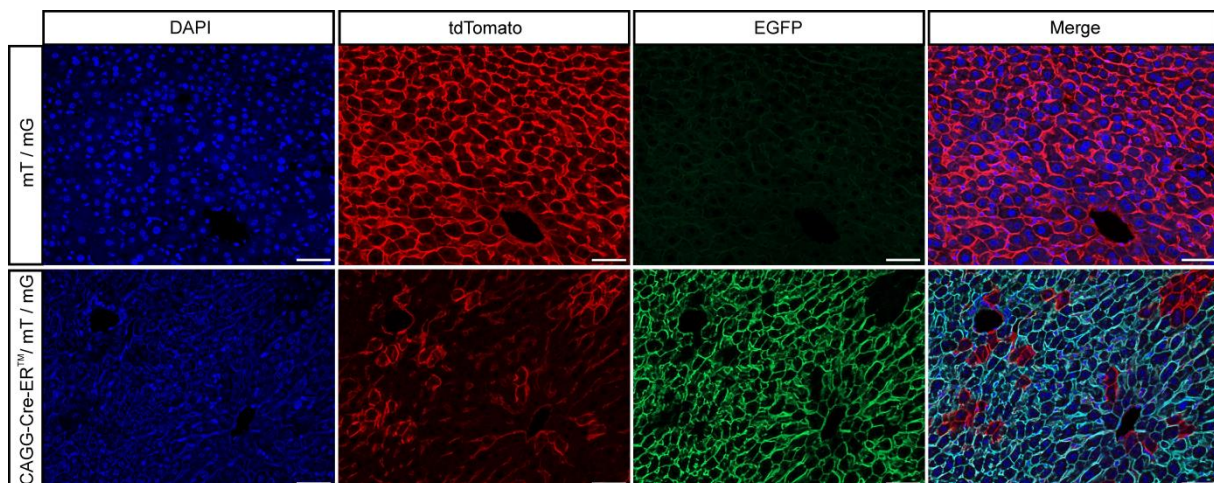


Abbildung 11: Expression von tdTomato und EGFP in der Leber von CAGG-Cre-ERTM / mT/mG Tieren nach Applikation von Tamoxifen mittels Augentropfen

Für die Induktion wurden die Versuchstiere von P 1 bis P 5 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg/ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten im Alter von 5-6 Wochen. Fluoreszenzmikroskopische Analysen zeigten in der Leber von CAGG-Cre-ERTM / mT/mG Tieren eine spezifische GFP-Expression in den Lebersinusoiden und Zentralvenen an; in mT/mG Mäusen war keine GFP-Expression erkennbar. Maßstabsbalken: 50 µm

Die fluoreszenzmikroskopische Begutachtung von Sagittalschnitten der Leber offenbarte in Tieren, die eine Cre-Rekombinase exprimierten, sowohl in den Lebersinusoiden, als auch im Bereich der Zentralvene ein positives EGFP-Signal. In Kontrolltieren war die spezifische Fluoreszenz nicht erkennbar (Abb 11).

Zusammenfassend konnte anhand der Reportermauslinie eine erfolgreiche Induktion der Cre-Rekombinase mittels Augentropfen nachgewiesen werden. Die fluoreszenzbasierten Untersuchungen in Niere und Leber belegten, dass die Induktion hierbei nicht auf das Auge beschränkt ist, sondern ubiquitär erfolgt.

Aufgrund dieser Befunde wurden im Folgenden CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tiere ebenfalls mit Tamoxifen-Augentropfen behandelt.

3.2 Die Rolle von Fibronektin im gesunden Mausauge

Die Behandlung der CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tiere erfolgte so, wie unter 3.1 beschrieben (Tamoxifen-Behandlung von P 1 – P 5; Präparation der Tiere im Alter von 5-6 Wochen). Zum direkten Vergleich wurden Tamoxifen-behandelte Geschwistertiere, die keine Cre-Rekombinase exprimierten (Fn^{fl/fl}), herangezogen.

3.2.1 Die Behandlung mit Tamoxifen-Augentropfen resultiert in einer Reduktion des Fibronektinspiegels im Trabekelwerk

Um Veränderungen bezüglich der Expression von Fibronektin spezifisch im Trabekelwerk untersuchen zu können, wurde für die molekularbiologischen Analysen ausschließlich der Bereich des Korneoskleralrings verwendet. Die mRNA-Expression wurde mittels quantitativer real-time RT-PCR ermittelt, wohingegen eine mögliche Varianz im Proteingehalt anhand von Western Blot Untersuchungen und immunhistochemischen Färbungen nachgewiesen wurde.

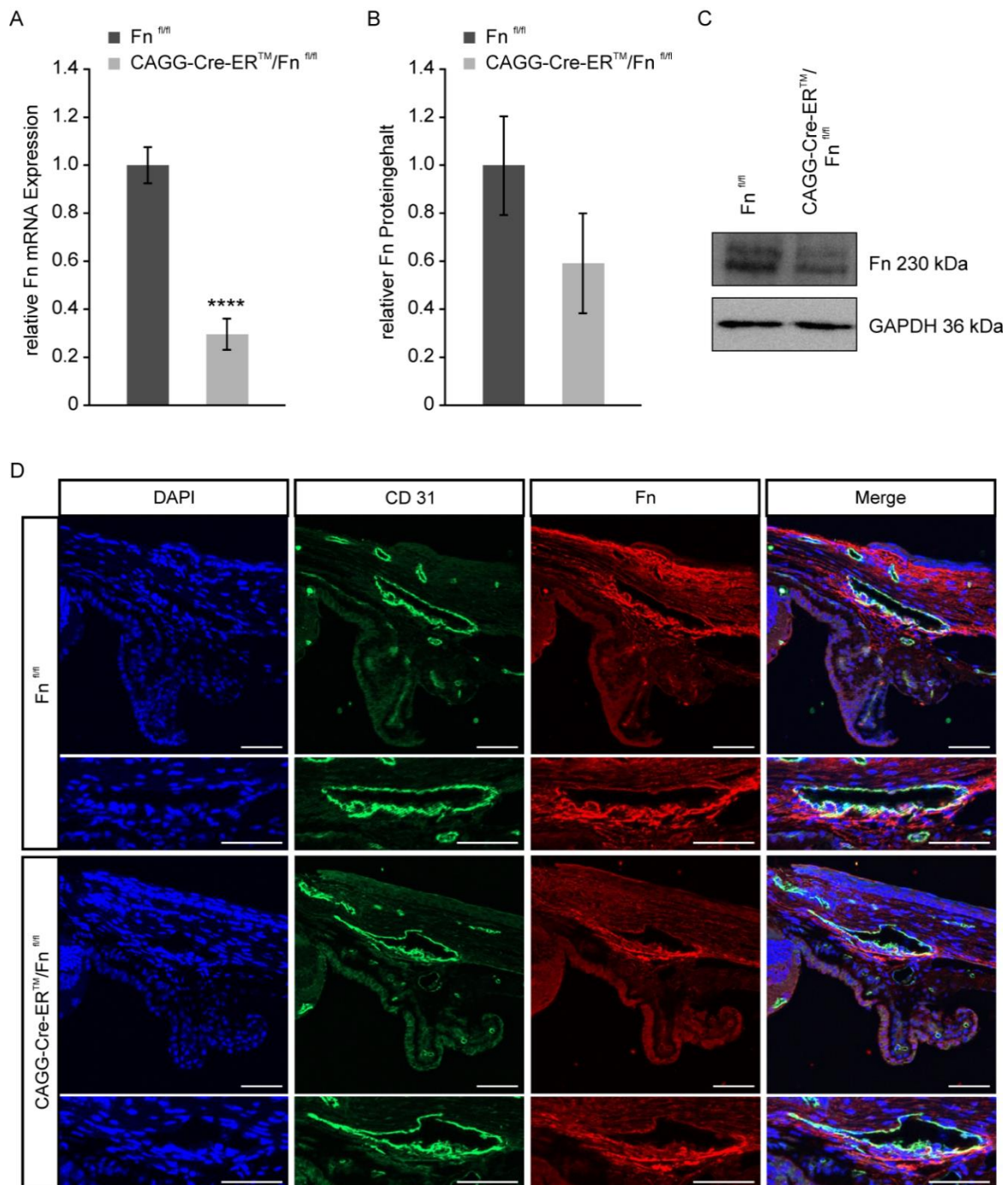


Abbildung 12: Reduktion von Fn und seiner mRNA im Trabekelwerk nach Tamoxifen-induzierter Deletion in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren

Für die Induktion wurden die Versuchstiere von P 1 bis P 5 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten im Alter von 5-6 Wochen. (A) Quantitative real-time RT-PCR Analysen des Korneoskleralringes zeigten im Vergleich zum Kontrolltier eine höchst signifikante Reduktion der trabekulären Fn mRNA-Expression in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren. (n = 10, n = 8; Mittelwert ± SEM; ****p<0,001). (B) Die densitometrische Auswertung von Western Blot Analysen bestätigte eine Abnahme von Fn im Trabekelwerk von CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren. Zur Normalisierung wurde GAPDH als Ladungskontrolle herangezogen. (n = 8, n = 6; Mittelwert ± SEM). (C) Repräsentative Western Blot Analyse für Fn in Fn^{fl/fl} und CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren. (D) Immunhistochemische Färbungen gegen Fn an Sagittalschnitten des Auges bekräftigten eine Verringerung von Fn im Trabekelwerk von CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren. Im oberen Panel ist jeweils der Kammerwinkel, im unteren Panel ein vergrößerter Ausschnitt des Trabekelwerks dargestellt. Maßstabsbalken: 50 µm

Quantitative real-time RT-PCR Untersuchungen des korneoskleralen Ringes zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe in den CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren eine höchst signifikante Reduktion der Fibronektin mRNA-Expression um 68 % an (****p<0,001) (Abb. 12 A).

Darüber hinaus dokumentierten Western Blot Analysen eine tendenzielle, statistisch aber nicht signifikante Abnahme des Proteingehalts im korneoskleralen Ring von CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Mäusen um etwa 40 % (Abb. 12 B).

Die immunhistochemischen Färbungen gegen Fibronektin an sagittalen Augenschnitten ließen in den Kontrolltieren eine deutliche Expression des Glykoproteins im Trabekelwerk erkennen. In CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Mäusen war im Vergleich dazu das Fluoreszenzsignal deutlich schwächer ausgeprägt. Demnach verbleibt auch 5-6 Wochen nach einer Deletion von Fibronektin ein verminderter Anteil des Glykoproteins im Trabekelwerk (Abb. 12 D).

Insgesamt konnte der Fibronektinspiegel im Trabekelwerk durch die Tamoxifen-induzierte Deletion deutlich gesenkt werden.

Im Folgenden stellte sich nun die Frage, inwieweit sich ein Mangel an Fibronektin auf die Morphologie bzw. Funktionalität des Trabekelwerks auswirkt.

3.2.2 Ein Mangel an Fibronektin hat keinen Einfluss auf die Entwicklung des Trabekelwerks

Die Entwicklung des Kammerwinkels im Mauseuge ist erst im Alter von etwa drei Lebenswochen abgeschlossen (Smith et al. 2001). Um zu überprüfen, ob die Deletion von Fibronektin ab dem postnatalen Tag 1 die Entwicklung des Auges – insbesondere des Trabekelwerks – negativ beeinflusst, wurde anhand von Semidünnschnitten die Morphologie des Kammerwinkels bzw. der juxtakanalikulären Region genauer betrachtet.

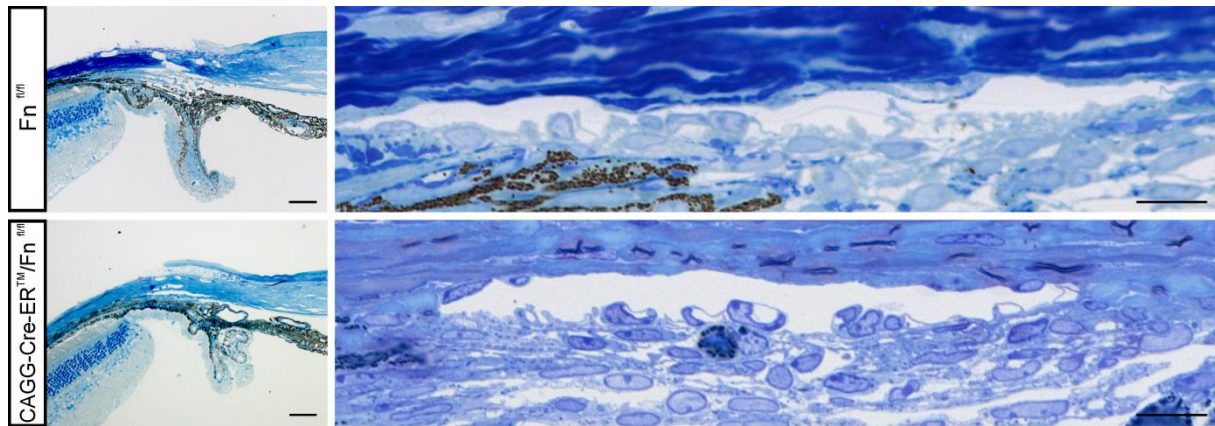


Abbildung 13: Semidünnschnitte des Kammerwinkels und der Schlemm-Kanal Region in Kontroll- und CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren nach Tamoxifen Induktion

Für die Induktion wurden die Versuchstiere ab dem postnatalen Tag 1 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten im Alter von etwa 5 Wochen. Histologische Färbeverfahren nach Richardson wiesen nach einer Deletion von Fibronektin auf keinerlei morphologische Veränderungen im vorderen Augenabschnitt hin. Links ist jeweils der Kammerwinkel, rechts ein vergrößerter Ausschnitt der Schlemm -Kanal Region abgebildet. Maßstabsbalken: 50 μ m

Anhand von Semidünnschnitten konnten bezüglich des Kammerwinkels keine auffälligen morphologischen Unterschiede zwischen den Fn^{fl/fl} und CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren verzeichnet werden (Abb. 13 links). Eine gezielte Betrachtung der Schlemm -Kanal Region ließ nach einer Deletion von Fibronektin lichtmikroskopisch ebenfalls keine offensichtlichen Veränderungen im Trabekelwerk erkennen (Abb. 13 rechts).

In einem weiteren Schritt erfolgte anhand der Transmissionselektronenmikroskopie eine genauere Untersuchung der juxtakanalikulären Region des Trabekelwerks.

3.2.3 Die Deletion von Fibronektin im Trabekelwerk resultiert in einer Reduktion von extrazellulärer Matrix

3.2.3.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

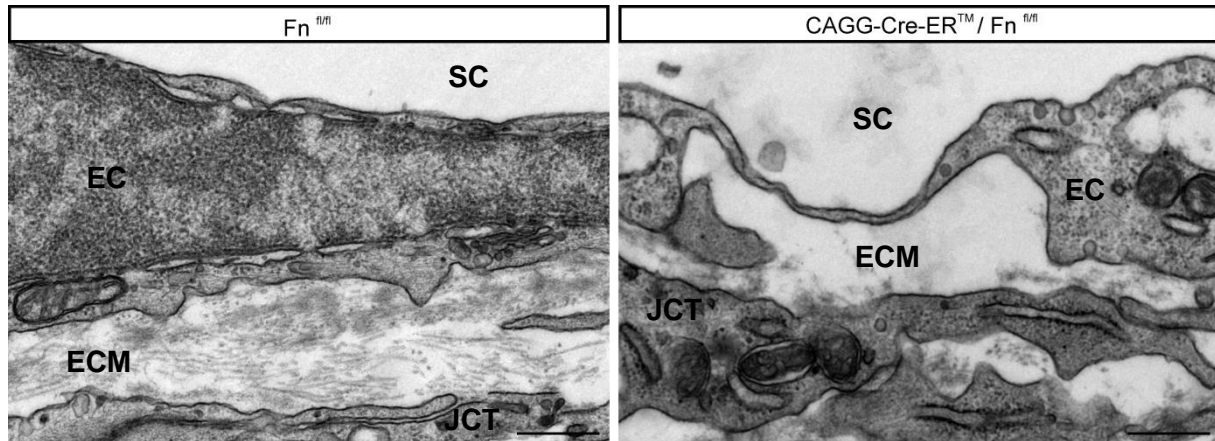


Abbildung 14: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Sagittalschnitten der juxtakanalikulären Region in $Fn^{fl/fl}$ und $CAGG-Cre-ER^{TM} / Fn^{fl/fl}$ Tieren

Für die Induktion wurden die Versuchstiere von P1 bis P5 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten im Alter von etwa 5-6 Wochen. Nach einer Deletion von Fibronektin erschien die ECM des juxtakanalikulären Gewebes deutlich aufgelockert. Eine Ablösung des Schlemm -Kanal Endothels vom darunterliegenden JCT war nicht ersichtlich. SC = Schlemm -Kanal, EC = Endothelzelle, ECM = extrazelluläre Matrix, JCT = Zelle des juxtakanalikulären Gewebes; Maßstabsbalken: 500 nm

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Sagittalschnitten der juxtakanalikulären Region des Trabekelwerks ließen in $CAGG-Cre-ER^{TM} / Fn^{fl/fl}$ Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutliche Reduktion des extrazellulären Materials erkennen. Zelluläre Veränderungen wurden hierbei nicht beobachtet (Abb. 14).

Um diese Beobachtungen zu verifizieren wurden zusätzlich Tangentialschnitte der juxtakanalikulären Region angefertigt.

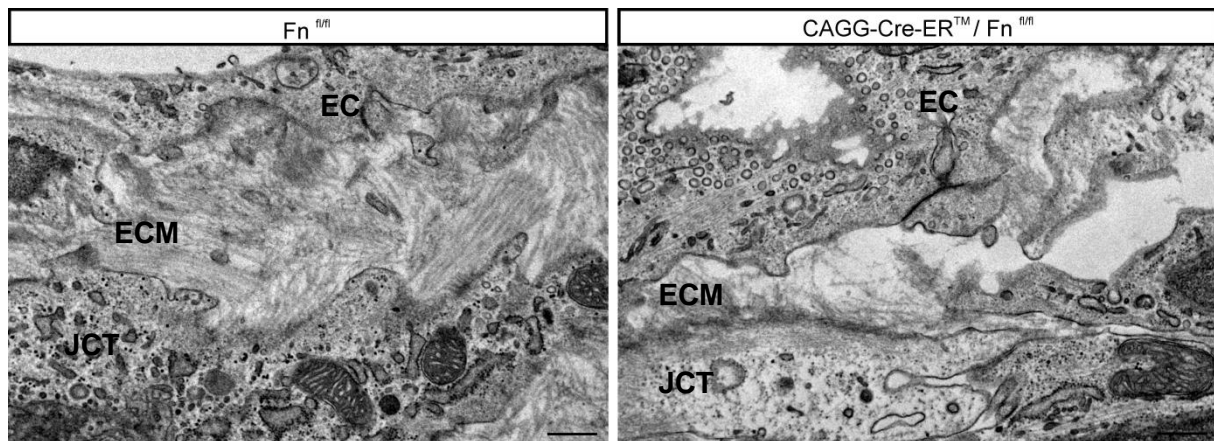


Abbildung 15: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Tangentialschnitten der juxta canalikulären Region in $Fn^{fl/fl}$ und $CAGG-Cre-ER^{TM} / Fn^{fl/fl}$ Tieren

Für die Induktion wurden die Versuchstiere von P1 bis P5 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten im Alter von etwa 5-6 Wochen. Tangentiale Schnitte der juxta canalikulären Region bestätigten eine Auflockerung der ECM im juxta canalikulären Gewebe von $CAGG-Cre-ER^{TM} / Fn^{fl/fl}$ Tieren. EC = Endothelzelle, ECM = extrazelluläre Matrix, JCT = Zelle des juxta canalikulären Gewebes; Maßstabsbalken: 500 nm

Die elektronenmikroskopischen Analysen von tangentialen Schnitten der juxta canalikulären Region ergaben ebenfalls eine vergleichsweise verminderte extrazelluläre Matrix in den doppelt-transgenen Tieren (Abb. 15).

Für eine quantitative Beurteilung dieser Beobachtungen wurde an sagittalen Ultradünnschnitten das Verhältnis der *optically empty spaces* – also desjenigen Bereichs, der frei von fibrillären Bestandteilen der extrazellulären Matrix war – relativ zur Gesamtfläche ermittelt. Hierbei wurde das Augenmerk auf die Region zwischen dem Schlemm -Kanal Endothel und der ersten Zellschicht des juxta canalikulären Gewebes gelegt.

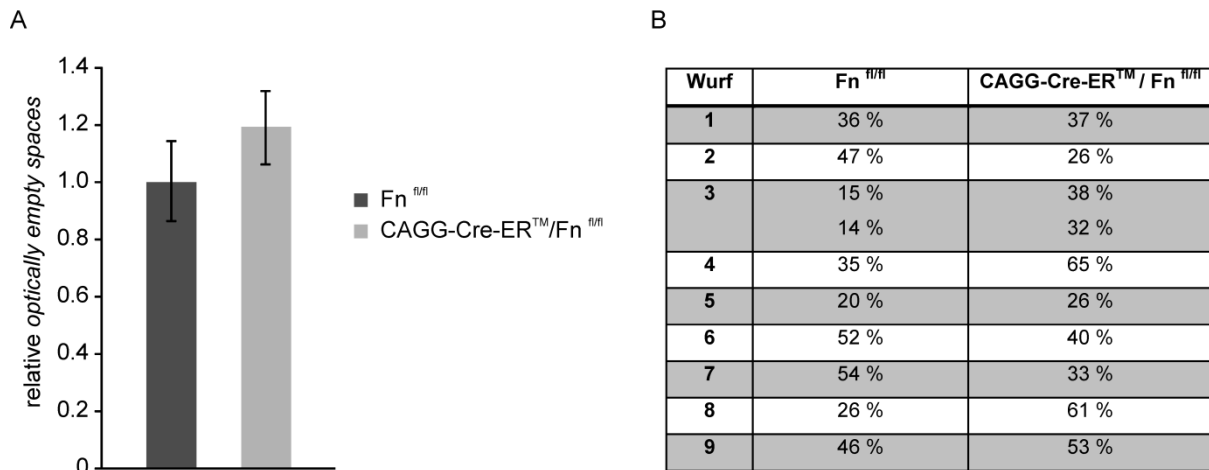


Abbildung 16: *Optically empty spaces* in der juxtaanalikulären Region von Kontroll- und CAGG-Cre-ERTM/ $Fn^{fl/fl}$ Tieren

Für die Induktion wurden die Versuchstiere von P1 bis P5 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten im Alter von 5-6 Wochen. (A) Die quantitative Analyse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen ergab im Mittel keinen signifikanten Anstieg der *optically empty spaces* im juxtaanalikulären Bereich von CAGG-Cre-ERTM/ $Fn^{fl/fl}$ Mäusen ($n = 10$, $n = 10$; Mittelwert \pm SEM). (B) Ein direkter Vergleich zwischen Geschwistertieren ergab in 60 % der Fälle einen Anstieg des prozentualen Anteils der *optically empty spaces* in CAGG-Cre-ERTM/ $Fn^{fl/fl}$ Mäusen.

Die quantitative Auswertung der elektronenmikroskopischen Beobachtungen ergab im Mittel keine signifikante Erhöhung der *optically empty spaces* in CAGG-Cre-ERTM/ $Fn^{fl/fl}$ Mäusen. Betrachtete man die Einzelwerte der untersuchten Tiere isoliert und nur im Vergleich zum jeweiligen Geschwistertier, so ließ sich in 60 % ein Anstieg der *optically empty spaces* verzeichnen (Abb. 16).

Inwieweit der Mangel an Fibronektin die Expressionsrate seiner Bindungspartner im Trabekelwerk beeinflusst, wurde anhand von quantitativer real-time RT-PCR Analysen überprüft.

3.2.3.2 Eine Deletion von Fibronektin resultiert in einer verringerten Expression ausgewählter ECM-Komponenten

Aufgrund unterschiedlicher Domänen kann Fibronektin nicht nur mit sich selbst, sondern auch mit einer Vielzahl anderer ECM-Komponenten, Zelloberflächenrezeptoren und Glykosaminen interagieren (Hynes, 1990; Mao & Schwarzbauer 2005). Dadurch stellt Fibronektin ein wichtiges Bindeglied zwischen den Zellen und deren Umgebung dar.

Im Folgenden ist die Auswirkung einer Deletion von Fibronectin auf die mRNA-Expression von Kollagen I, Kollagen IV, Elastin, Fibrillin-1 und Integrin- β 1 im Trabekelwerk dargestellt.

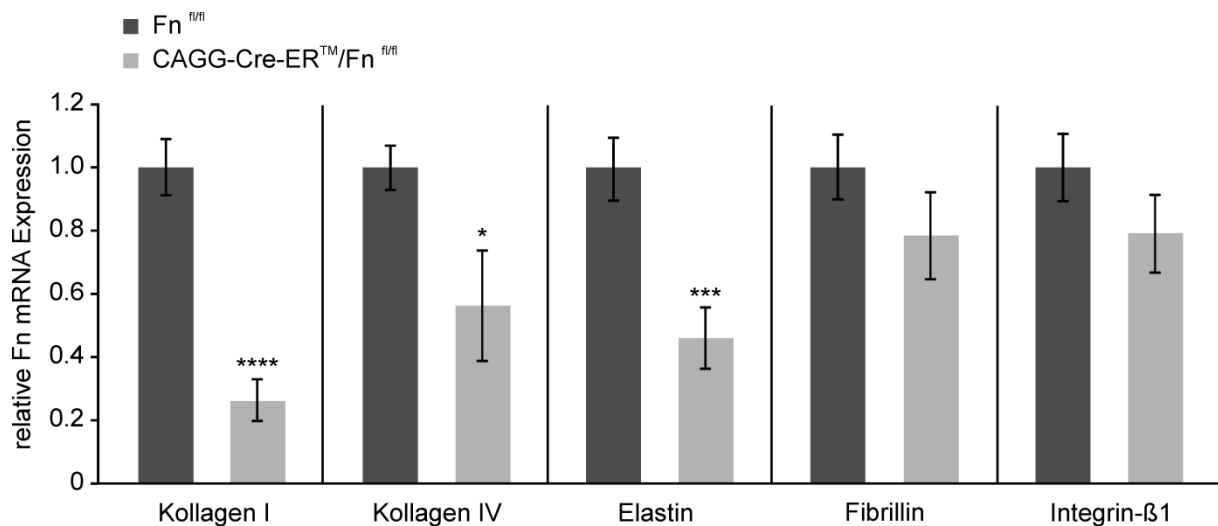


Abbildung 17: Relatives mRNA-Expressionslevel von Kollagen I, IV, Elastin, Fibrillin-1 und Integrin- β 1 in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren

Für die Induktion wurden die Versuchstiere von P1 bis P5 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten im Alter von 5-6 Wochen. Quantitative real-time RT-PCR Analysen des Korneoskleralrings dokumentierten eine signifikante Reduktion der Kollagen I, Kollagen IV und Elastin mRNA-Expression in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren. Der Gehalt an Fibrillin-1 und Integrin- β 1 war im Vergleich zum Kontrolltier nicht signifikant verändert ($n \geq 8$, $n \geq 6$; Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$ **** $p < 0,001$).

Quantitative real-time RT-PCR Analysen des Korneoskleralrings zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme der mRNA-Expression von Kollagen I ($n = 9$, $n = 6$, **** $p < 0,001$), Kollagen IV ($n = 8$, $n = 6$, * $p < 0,05$) und Elastin ($n = 9$, $n = 7$, *** $p < 0,005$) im Trabekelwerk von CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren an. Im Gegensatz dazu war die Expressionsrate von Fibrillin-1 ($n = 10$, $n = 8$) und Integrin- β 1 ($n = 9$, $n = 6$) nach einer Deletion von Fibronectin nicht beeinträchtigt (Abb. 17).

3.2.4 Die Deletion von Fibronectin hat keinen Einfluss auf α -smooth muscle-actin (α -SMA)

Pattabiraman & Rao (2010) konnten in humanen Trabekelwerkszellen einen Zusammenhang zwischen Fibronectin und der Expression von α -SMA – einem Indikator für die Kontraktilität des Trabekelwerks – nachweisen.

Um zu untersuchen, ob die Deletion von Fibronektin - mitsamt den oben genannten Veränderungen in der extrazellulären Matrix - die Menge an α -SMA im Trabekelwerk beeinflusst, wurde an Sagittalschnitten des Auges eine immunhistochemische Färbung gegen α -SMA durchgeführt.

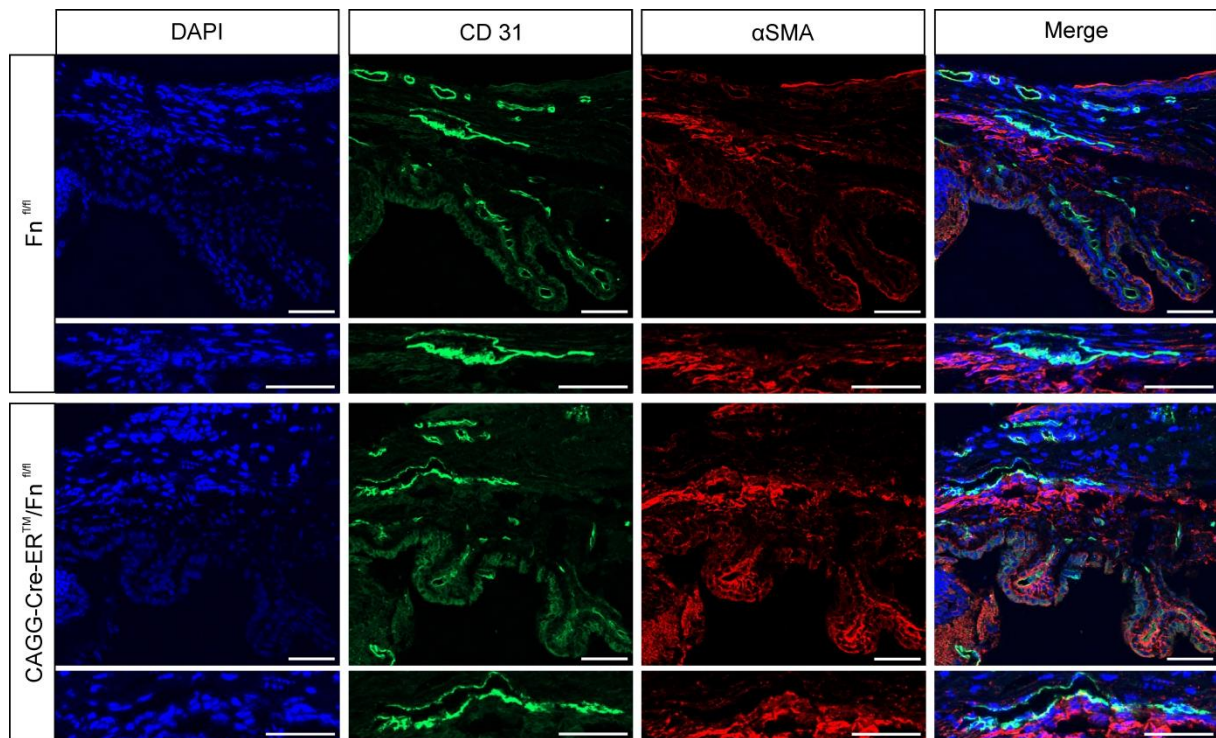


Abbildung 18: Immunhistochemische Färbung gegen α -SMA an sagittalen Schnitten in $Fn^{fl/fl}$ und CAGG-Cre-ERTM / $Fn^{fl/fl}$ Tieren

Für die Induktion wurden die Versuchstiere von P1 bis P5 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten im Alter von 5-6 Wochen. Immunhistochemische Analysen bezüglich α -SMA zeigten im Trabekelwerk beider Versuchsgruppen keinen relevanten Unterschied. Im oberen Panel ist jeweils der Kammerwinkel, im unteren Panel ein vergrößerter Ausschnitt des Trabekelwerks abgebildet. Maßstabsbalken: 50 μ m

Die immunhistochemischen Untersuchungen gegen α -SMA ließen eine deutliche Färbung sowohl im Ziliarmuskel, als auch im Trabekelwerk beider Versuchsgruppen erkennen. Im direkten Vergleich konnte zwischen den $Fn^{fl/fl}$ und CAGG-Cre-ERTM / $Fn^{fl/fl}$ Tieren kein Unterschied verzeichnet werden (Abb. 18).

3.2.5 Die Deletion von Fibronektin hat keinen Einfluss auf den intraokulären Druck

Um zu überprüfen, ob im gesunden Mauseye eine Deletion von Fibronektin den intraokulären Druck beeinträchtigt, wurde dieser im Alter von 5-6 Wochen applanationstonometrisch ermittelt.

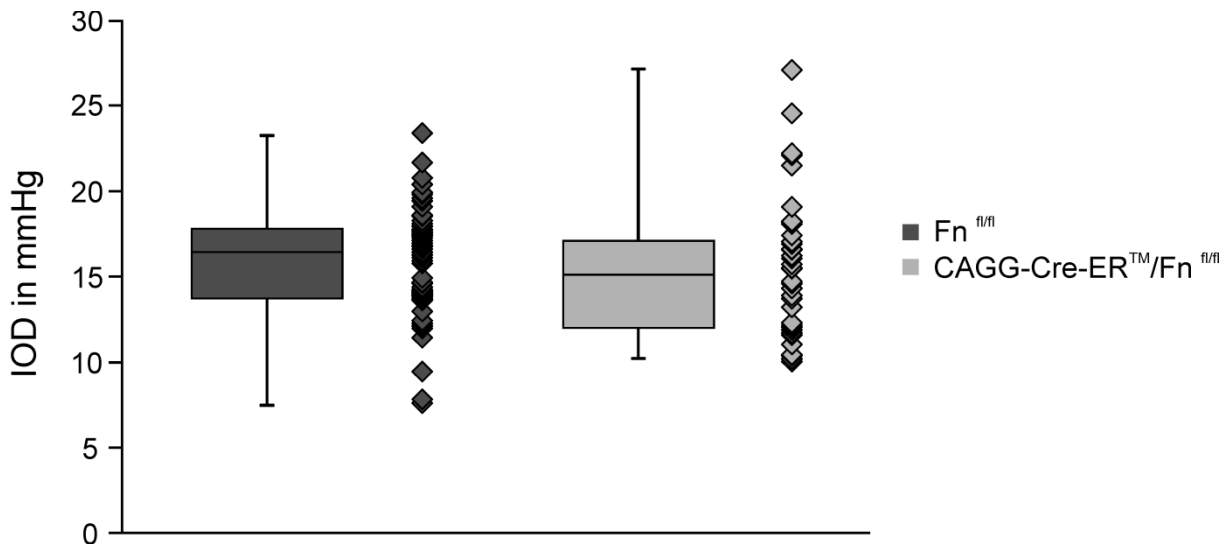


Abbildung 19: Applanationstonometrische Messung des intraokulären Drucks in $Fn^{fl/fl}$ und $CAGG-Cre-ER^{TM}/Fn^{fl/fl}$ Mäusen

Für die Induktion wurden die Versuchstiere von P 1 bis P 5 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Messungen erfolgten im Alter von 5-6 Wochen. Die Messwerte ließen in den $CAGG-Cre-ER^{TM}/Fn^{fl/fl}$ im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen Unterschied bezüglich des IOD Tieren erkennen. (Links: Median mit Maximum / Minimum bzw. oberes / unteres Quartil; rechts: Einzelwerte der IOD-Messungen; n = 34, n = 21)

5-6 Wochen nach Induktionsbeginn lag der durchschnittliche intraokuläre Druck in $Fn^{fl/fl}$ Mäusen bei $15,9 \pm 0,4$ mmHg (Mittelwert \pm SEM), derjenige von $CAGG-Cre-ER^{TM}/Fn^{fl/fl}$ Tieren im Mittel bei $15,4 \pm 0,6$ mmHg. Zwischen den beiden Versuchsgruppen konnte also kein Unterschied verzeichnet werden (Abb. 19).

3.3 Der Einfluss von Fibronektin beim primären Offenwinkelglaukom

Um die Rolle dieses Glykoproteins beim POWG genauer zu untersuchen, kam in der hier vorliegenden Studie das $\beta B1$ -CTGF Mausmodell zum Einsatz. Diese Tiere zeichnen sich durch eine vermehrte Expression von CTGF unter Kontrolle des

linsenspezifischen β B1-Crystallin Promotors aus und zeigen bereits nach dem ersten Lebensmonat typische Anzeichen eines POWG (Junglas et al. 2012). Im Folgenden wurden β B1-CTGF Mäuse (CD 1) mit CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} (C57BL/6) Tieren verpaart. Die Induktion der Cre-Rekombinase erfolgte – wie unter 3.2 beschrieben – durch eine Behandlung mit Tamoxifen-Augentropfen von postnatalem Tag 1 bis 5.

3.3.1 Eine linsenspezifische Überexpression von CTGF in CD 1 x C57BL/6 Mäusen führt langfristig zu einem Sehnervschaden

Junglas und Kollegen (2012) verwendeten in ihrer Studie Mäuse mit FVB / N x CD 1 Hintergrund. Um zu überprüfen, ob das β B1-CTGF Mausmodell in Tieren der CD 1 x C57BL/6 Linie ebenfalls greift, wurde zunächst die Axonanzahl der Sehnerven, der intraokuläre Druck (IOD), sowie die Proteinmenge von α -SMA und Fibronektin im Trabekelwerk von Fn^{fl/fl} und β B1-CTGF / Fn^{fl/fl} Mäusen ermittelt. Um im Gesamtbild einen möglichen Einfluss von Tamoxifen auszuschließen, wurden die Tiere – ebenso wie Mäuse, die eine Cre-Rekombinase exprimierten – mit Augentropfen behandelt.

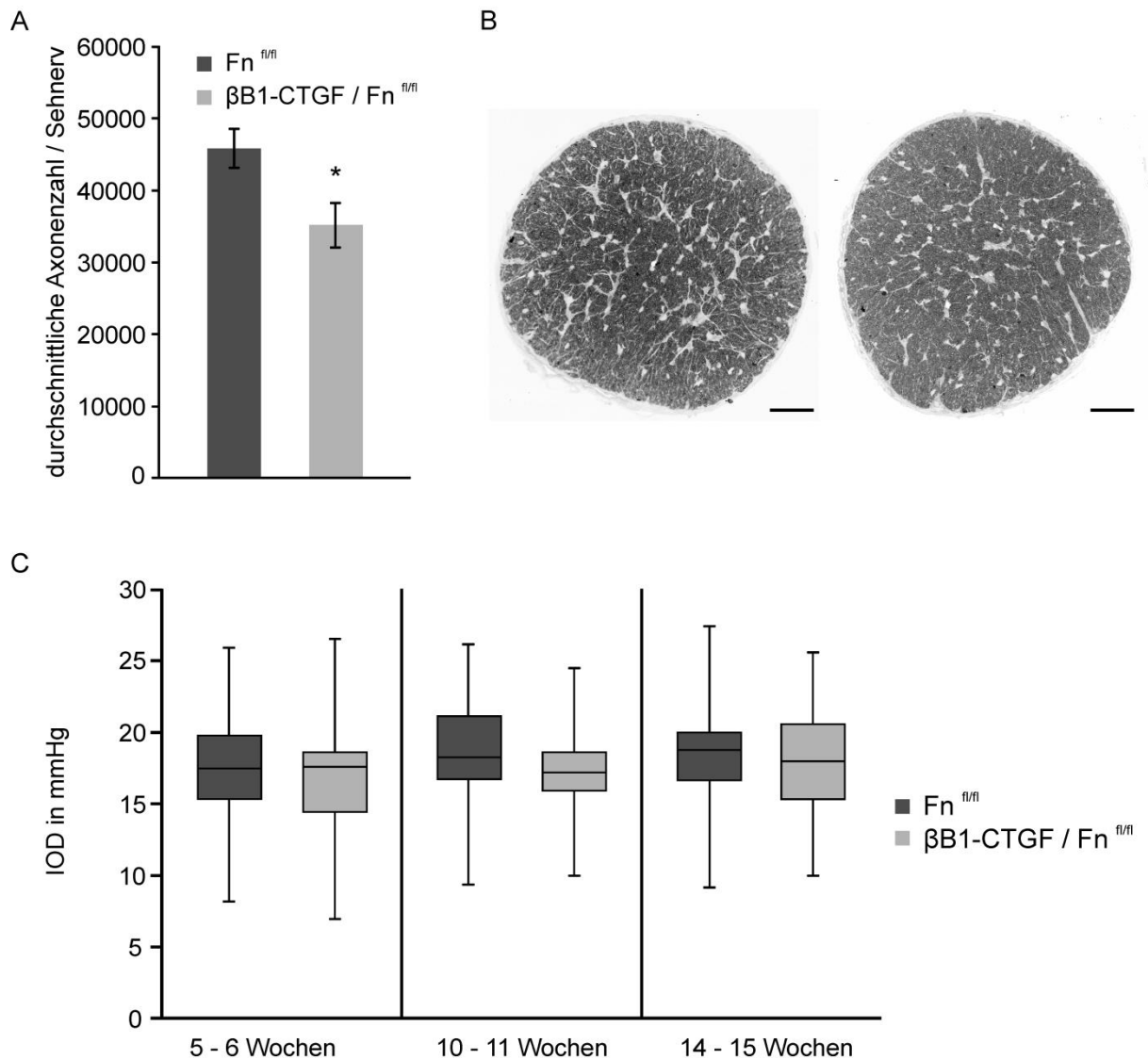


Abbildung 20: Die lensenspezifische Überexpression von CTGF führt langfristig zu einem Sehnervenschaden

Die Versuchstiere wurden von P 1 bis P 5 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. (A) Durchschnittliche Axonanzahl der Sehnerven von $Fn^{fl/fl}$ und $\beta B1-CTGF / Fn^{fl/fl}$ Tieren im Alter von 14-15 Wochen. Mäuse mit einer lensenspezifischen Überexpression von CTGF zeigten eine signifikant niedrigere Anzahl von Sehnervaxonen ($n=6$, $n=7$; $*p<0,05$). (B) Exemplarische Semidünn-Schnitte der Sehnerven von $Fn^{fl/fl}$ und $\beta B1-CTGF / Fn^{fl/fl}$ Tieren. Maßstabsbalken: 50 μm (C) Tonometrische Messungen des IOD im Alter von 5 - 6, 10 - 11 und 14 - 15 Wochen. Die Messungen ließen zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den $Fn^{fl/fl}$ und $\beta B1-CTGF / Fn^{fl/fl}$ Mäusen erkennen (Median mit Maximum / Minimum bzw. oberem / unterem Quartil $n \geq 19$, $n \geq 16$)

Im Alter von 14-15 Wochen betrug die durchschnittliche Axonanzahl der Sehnerven in den $Fn^{fl/fl}$ Tieren 45859 ± 2642 (Mittelwert \pm SEM); mit einer Menge von 35143 ± 3094 Axonen wiesen Mäuse mit einer lensenspezifischen Überexpression von CTGF eine signifikant geringere Anzahl von Sehnervaxonen auf (Abb. 20 A).

Applanationstonometrische Messungen des intraokulären Drucks im Alter von 5-6 Wochen zeigten für $\text{Fn}^{\text{fl/fl}}$ Tiere im Mittel einen Wert von $17,5 \pm 0,6$ mmHg (Mittelwert \pm SEM) an. Bei den $\beta\text{B1-CTGF} / \text{Fn}^{\text{fl/fl}}$ Mäusen betrug der Messwert durchschnittlich $16,9 \pm 0,7$ mmHg. Nach 10-11 Lebenswochen belief sich der intraokuläre Druck auf $18,6 \pm 0,5$ ($\text{Fn}^{\text{fl/fl}}$) und $17,4 \pm 0,6$ mmHg ($\beta\text{B1-CTGF} / \text{Fn}^{\text{fl/fl}}$). Im Alter von 14-15 Wochen konnte für $\text{Fn}^{\text{fl/fl}}$ Tiere ein mittlerer Druckwert von $18,3 \pm 0,7$ mmHg verzeichnet werden; bei Mäusen mit einer Überexpression von CTGF lag der intraokuläre Druck bei $18,1 \pm 0,7$ mmHg. Zu keinem der beobachteten Zeitpunkte konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen nachgewiesen werden (Abb. 20 C).

Im Weiteren wurde mittels einer immunhistochemischen Färbung die Menge an α -SMA im Trabekelwerk von $\text{Fn}^{\text{fl/fl}}$ und $\beta\text{B1-CTGF} / \text{Fn}^{\text{fl/fl}}$ Tieren untersucht.

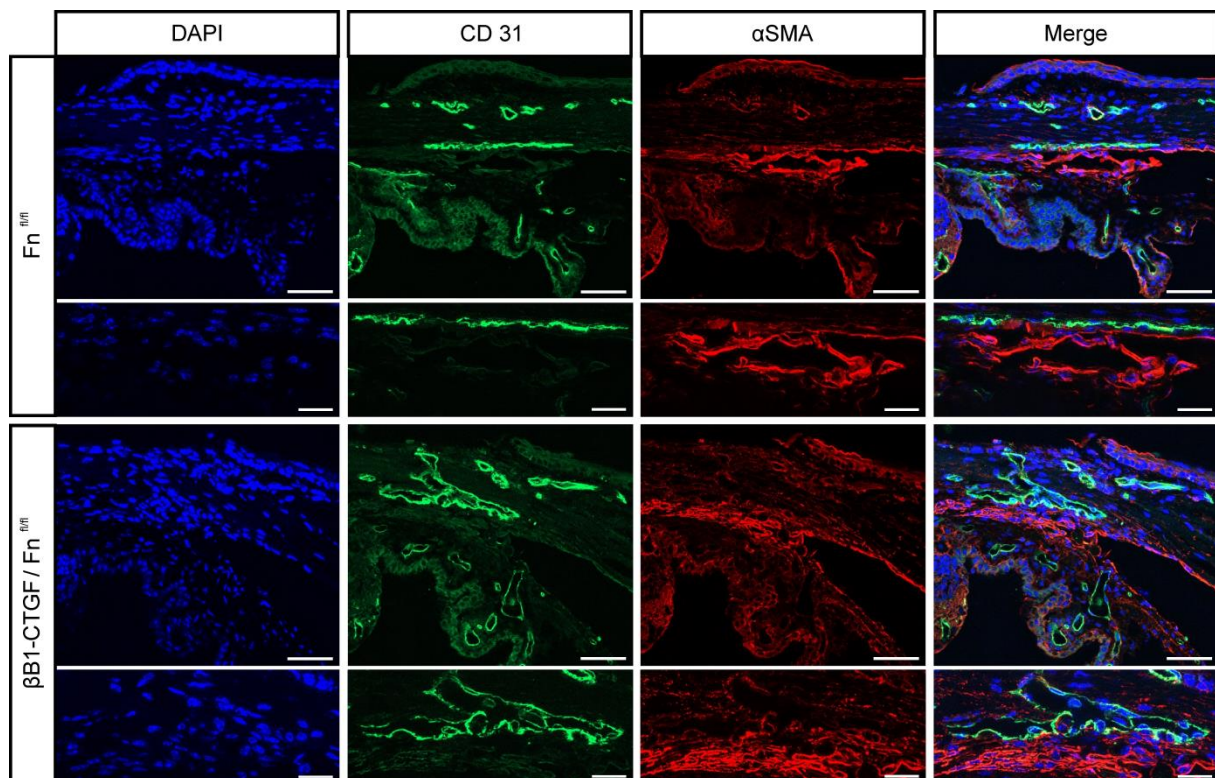


Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung gegen α -SMA im Kammerwinkel von $\text{Fn}^{\text{fl/fl}}$ und $\beta\text{B1-CTGF} / \text{Fn}^{\text{fl/fl}}$ Mäusen

Die Versuchstiere wurden von P 1 bis P 5 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Das Gewebe wurde im Alter von 14 – 15 Wochen untersucht. Immunhistochemische Untersuchungen gegen α -SMA zeigten in Relation zum Kontrolltier eine erhöhte Expression des Proteins im Trabekelwerk von $\beta\text{B1-CTGF} / \text{Fn}^{\text{fl/fl}}$ Mäusen. Im oberen Panel ist jeweils der Kammerwinkel, im unteren Panel ein vergrößerter Ausschnitt des Trabekelwerks abgebildet. Maßstabsbalken: oben 50 μm , unten 20 μm

Immunhistochemische Färbungen gegen α -SMA dokumentierten im Kammerwinkel beider Versuchsgruppen eine spezifische Färbung des Proteins im Trabekelwerk. Ähnlich wie bei den Untersuchungen von Junglas et al (2012) zeigten β B1-CTGF / Fn^{fl/fl} Tiere eine im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Menge an α -SMA (Abb. 21).

Inwieweit der erhöhte Level von α -SMA mit einer Expression von Fibronektin korreliert, sollten immunhistochemische Färbungen gegen das Glykoprotein aufzeigen.

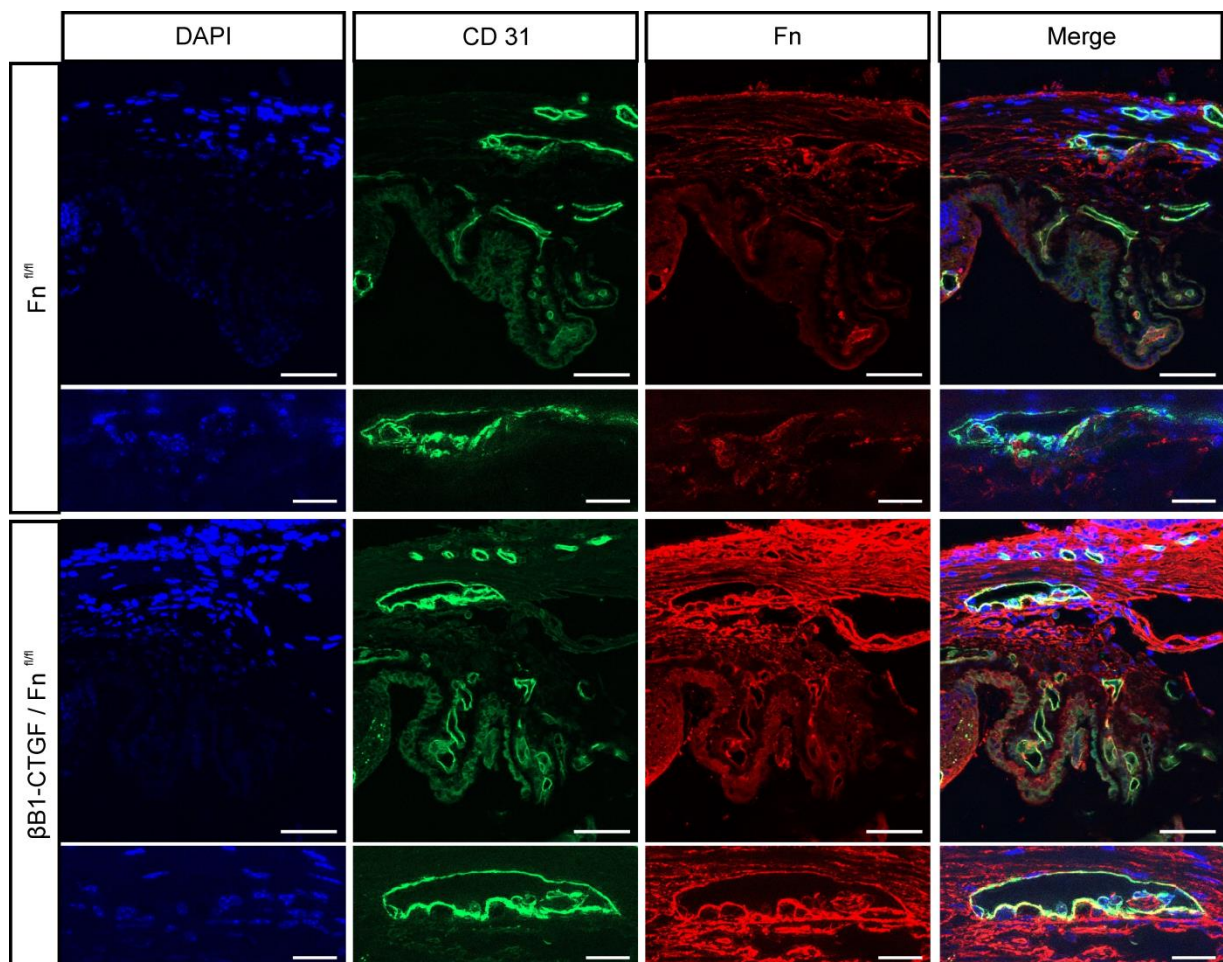


Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung gegen Fibronektin im Kammerwinkel von Fn^{fl/fl} und β B1-CTGF / Fn^{fl/fl} Tieren

Die Versuchstiere wurden von P 1 bis P 5 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Das Gewebe wurde im Alter von 14 – 15 Wochen untersucht. Immunhistochemische Färbungen gegen Fibronektin an Sagittalschnitten des Auges ließen in Relation zum Kontrolltier eine erhöhte Expression des Glykoproteins im Trabekelwerk von β B1-CTGF / Fn^{fl/fl} Mäusen erkennen. Im oberen Panel ist jeweils der Kammerwinkel, im unteren Panel ein vergrößerter Ausschnitt des Trabekelwerks abgebildet. Maßstabsbalken: oben 50 μ m, unten 20 μ m

Immunhistochemische Untersuchungen gegen Fibronektin an sagittalen Augenschnitten zeigten in Relation zum Kontrolltier im Kammerwinkel von β B1-CTGF / Fn^{fl/fl} Mäusen eine erhöhte Menge des Glykoproteins (Abb. 22).

3.3.2 Analyse der Fibronektinmenge im Kammerwinkel von β B1-CTGF Tieren nach Tamoxifen-induzierter ubiquitärer Deletion

Um aufzuzeigen, ob mit Hilfe des Tamoxifen-induzierten Cre/loxP-Systems eine trabekuläre Reduktion von Fibronektin im β B1-CTGF Mausmodell erzielt werden kann, wurde im Folgenden eine immunhistochemische Färbung gegen das Glykoprotein durchgeführt.

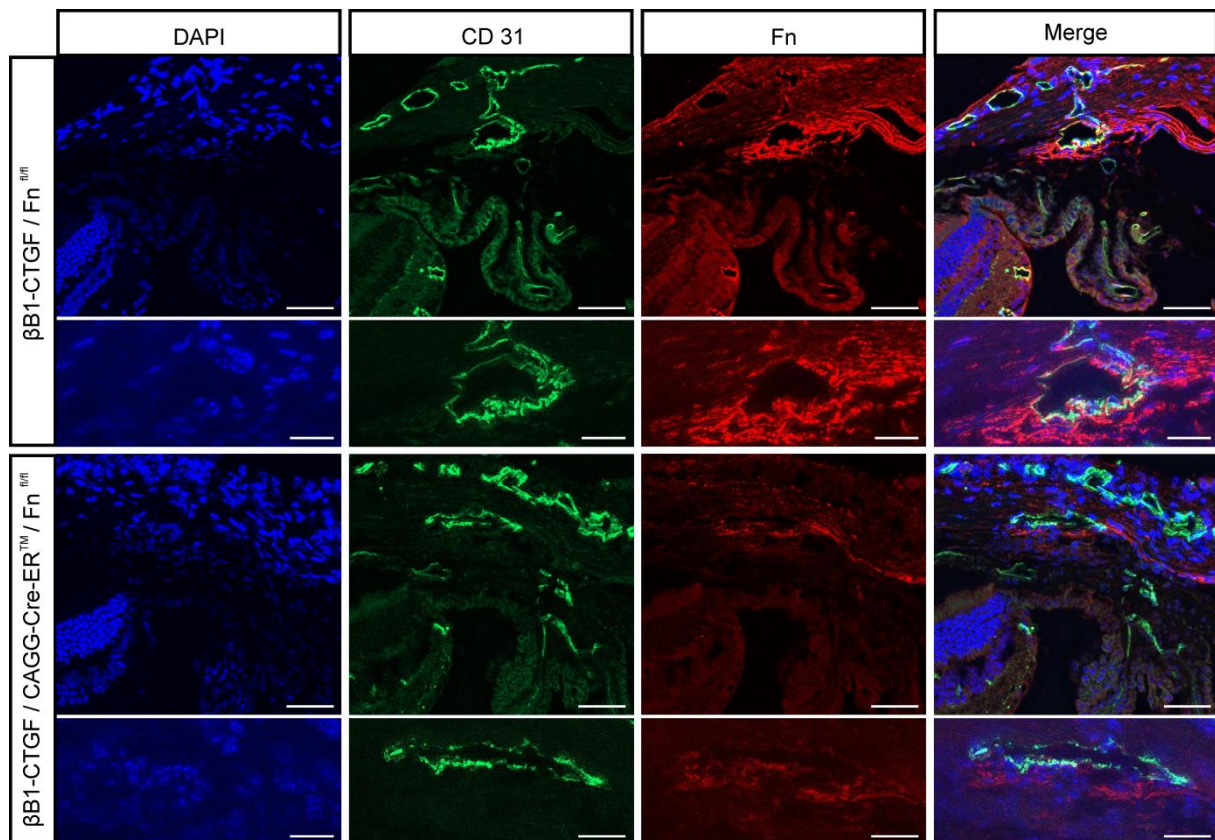


Abbildung 23: Reduktion des Fn Proteingehalts im Kammerwinkel von β B1-CTGF / CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren nach Tamoxifen-induzierter Deletion

Die Versuchstiere wurden von P 1 bis P 5 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchung des Gewebes erfolgte im Alter von 14 – 15 Wochen. Die immunhistochemischen Analysen bezüglich Fibronektin zeigten im Vergleich zu den β B1-CTGF Mäusen eine deutliche Reduktion des Glykoproteins im Trabekelwerk von β B1-CTGF / CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren an. Im oberen Panel ist jeweils der Kammerwinkel, im unteren Panel ein vergrößerter Ausschnitt des Trabekelwerks abgebildet. Maßstabsbalken: oben 50 μ m, unten 20 μ m

Die immunhistochemischen Färbungen gegen Fibronectin ließen im Vergleich zu den β B1-CTGF Mäusen ein deutlich verringertes Signal im Kammerwinkel von β B1-CTGF / CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren erkennen (Abb. 23). Demzufolge konnte anhand des hier angewandten Protokolls eine Deletion von Fibronectin auch in Mäusen mit einer linsenspezifischen Überexpression von CTGF erreicht werden.

3.3.3 Eine Deletion von Fibronectin hat im β B1-CTGF Mausmodell keinen Einfluss auf die Entstehung des POWG

Inwieweit die Deletion von Fibronectin den progressiven Verlauf der Glaukomerkrankung im β B1-CTGF Mausmodell beeinflussen kann, wurde anhand einer Quantifizierung des Sehnervenschadens, sowie der Messung des intraokulären Drucks ermittelt.

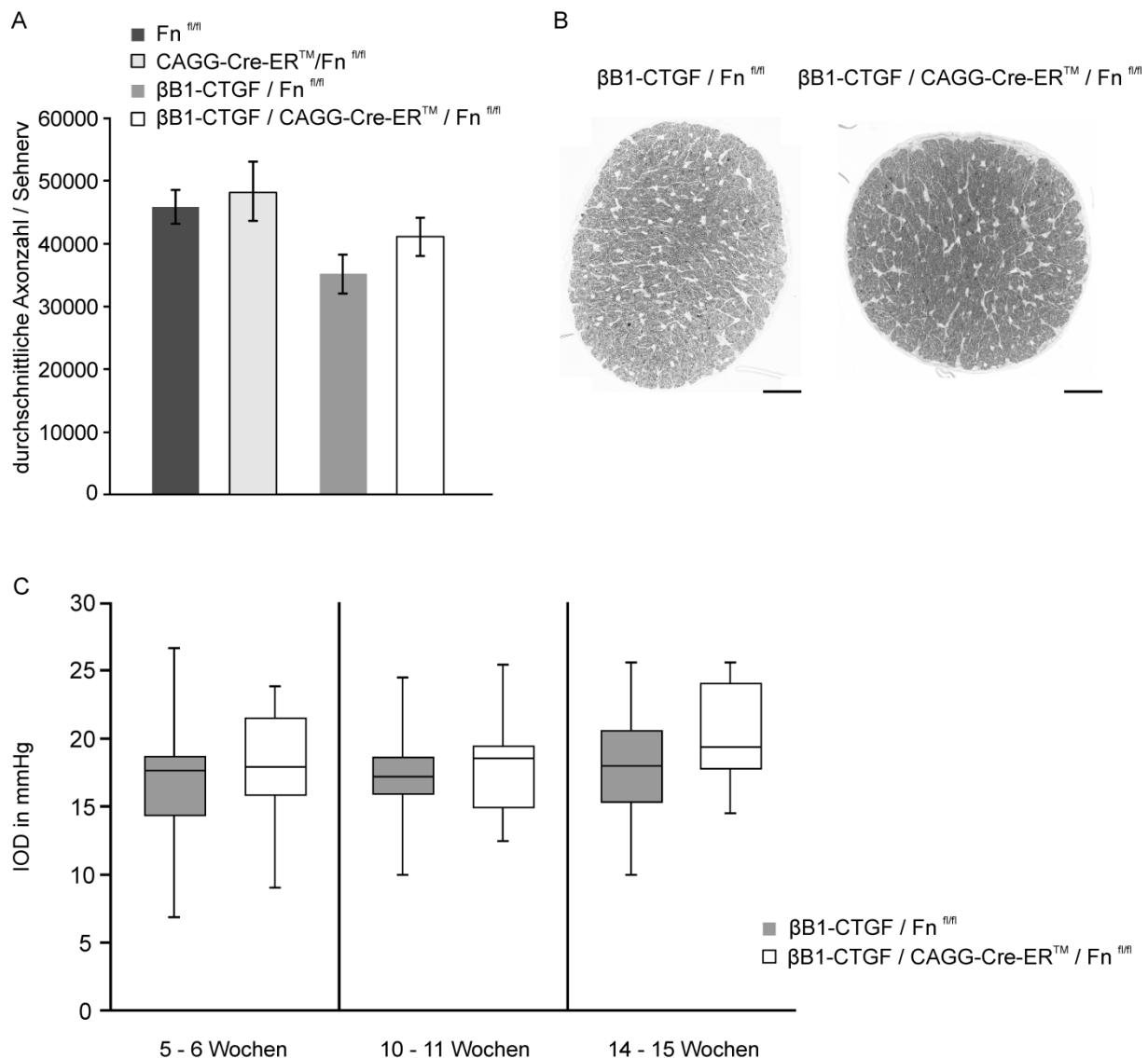


Abbildung 24: Eine Deletion von Fibronektin in $\beta B1$ -CTGF Tieren hat keinen signifikanten Einfluss auf die Sehnervschädigung und den intraokulären Druck

Die Versuchstiere wurden von P 1 bis P 5 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. (A) Durchschnittliche Axonzahl der Sehnerven in $Fn^{fl/fl}$, CAGG-Cre-ERTM / $Fn^{fl/fl}$, $\beta B1$ -CTGF / $Fn^{fl/fl}$ und $\beta B1$ -CTGF / CAGG-Cre-ERTM / $Fn^{fl/fl}$ Mäusen im Alter von 14-15 Wochen. Tiere mit einer linsenspezifischen Überexpression von CTGF zeigten im Vergleich zu den $Fn^{fl/fl}$ und CAGG-Cre-ERTM / $Fn^{fl/fl}$ Mäusen eine tendenziell, aber nicht signifikant niedrigere Anzahl von Sehnervaxonen. Eine Deletion von Fibronektin führte zu keiner signifikanten Veränderung der Axonzahl ($n=6$, $n=3$, $n=7$, $n=7$; Mittelwert \pm SEM). (B) Exemplarische Semidünn-Schnitte der Sehnerven von $\beta B1$ -CTGF / $Fn^{fl/fl}$ und $\beta B1$ -CTGF / CAGG-Cre-ERTM / $Fn^{fl/fl}$ Tieren. Maßstabsbalken: 50 μm (C) Applanationstonometrische Messungen des IOD von $\beta B1$ -CTGF / $Fn^{fl/fl}$ und $\beta B1$ -CTGF / CAGG-Cre-ERTM / $Fn^{fl/fl}$ Tieren im Alter von 5 - 6, 10 - 11 und 14 - 15 Wochen. Die Messungen ließen zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen erkennen (Median mit Maximum / Minimum bzw. oberem / unterem Quartil $n \geq 16$, $n \geq 6$)

Im Alter von 14-15 Wochen betrug die durchschnittliche Axonzahl der Sehnerven in den $Fn^{fl/fl}$ Tieren im Mittel 45859 ± 2642 ; mit einer Menge von 48502 ± 4728

Axonen pro Sehnerv zeigten die CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Mäuse eine ähnliche Axondichte. Tiere mit einer linsenspezifischen Überexpression von CTGF wiesen gegenüber diesen beiden Versuchsgruppen eine tendenziell, jedoch nicht signifikant geringere Anzahl von Sehnervaxonen auf (35143 ± 3094). Im direkten Vergleich zu den β B1-CTGF / Fn^{fl/fl} Mäusen war die Zahl der Axone in den β B1-CTGF / CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren tendenziell leicht erhöht (41260 ± 2880) (Abb. 24 A).

Applanationstonometrische Messungen des intraokulären Drucks im Alter von 5-6 Wochen zeigten für die Fn^{fl/fl} Tiere im Mittel einen Wert von $17,5 \pm 0,6$ mmHg (Mittelwert \pm SEM) an. Übereinstimmend mit Abb. 19 hatte eine Deletion von Fibronektin im gesunden Mausauge auch in CD 1 x C57BL/6 Tieren keine Auswirkungen auf den intraokulären Druck (CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} $17,7 \pm 1,3$ mmHg) (nicht gezeigt). Ebenso verhielt es sich im glaukomatösen Modell. Im Vergleich zu den β B1-CTGF / Fn^{fl/fl} Mäusen ($16,9 \pm 0,7$ mmHg) war der Druck in den β B1-CTGF / CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren nur geringfügig verändert ($17,9 \pm 1,1$ mmHg) (Abb. 24 C, links). Druckmessungen im Alter von 10-11 Wochen zeigten ein ganz ähnliches Bild auf. Der intraokuläre Druck für die verschiedenen Versuchsgruppen belief sich auf folgende Werte: $18,6 \pm 0,5$ (Fn^{fl/fl}), $18 \pm 0,8$ (CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl}) (nicht gezeigt), $17,4 \pm 0,6$ (β B1-CTGF / Fn^{fl/fl}) und $17,7 \pm 0,9$ (β B1-CTGF / CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl}) (Abb. 24 C, Mitte). Nach 14-15 Lebenswochen konnte für Fn^{fl/fl} Tiere ein mittlerer Wert von $18,3 \pm 0,7$ mmHg verzeichnet werden. CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Mäuse zeigten einen durchschnittlichen intraokulären Druck von 20 ± 1 mmHg an (nicht gezeigt). Der entsprechende Messwert bei Tieren mit einer Überexpression von CTGF lag bei $18,1 \pm 0,7$ mmHg, derjenige von β B1-CTGF / CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Mäusen bei $20,2 \pm 1$ mmHg (Abb. 24 C, rechts).

3.3.4 Die Deletion von Fibronektin im β B1-CTGF Mausmodell hat keinen Einfluss auf die Proteinmenge von α -SMA

Um zu prüfen, ob im β B1-CTGF Mausmodell eine Defizienz von Fibronektin die Proteinmenge von α -SMA im Trabekelwerk beeinflusst, wurde eine immunhistochemische Färbung gegen α -SMA durchgeführt.

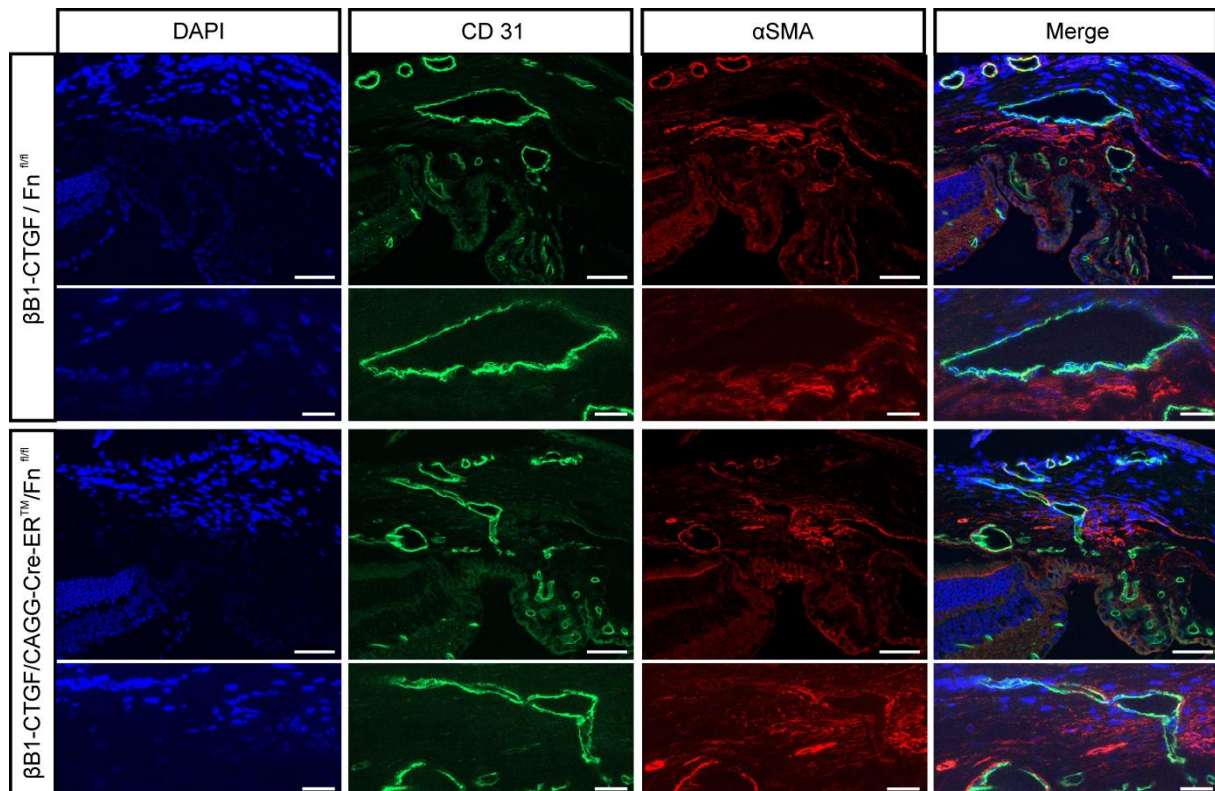


Abbildung 25: Immunhistochemische Färbung gegen α -SMA im Kammerwinkel von β B1-CTGF / Fn^{fl/fl} und β B1-CTGF / CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Mäusen

Die Versuchstiere wurden von P 1 bis P 5 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Das Gewebe wurde im Alter von 14 – 15 Wochen untersucht. Die immunhistochemische Färbung gegen α -SMA zeigte im Vergleich zum β B1-CTGF / Fn^{fl/fl} Tier keine deutlich veränderte Expression des Proteins im Trabekelwerk der β B1-CTGF / CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Maus an. Im oberen Panel ist jeweils der Kammerwinkel, im unteren Panel ein vergrößerter Ausschnitt des Trabekelwerks abgebildet. Maßstabsbalken: oben 50 μ m, unten 20 μ m

Erste immunhistochemische Analysen bezüglich α -SMA ergaben keine relevanten Unterschiede der Proteinmenge im Trabekelwerk von β B1-CTGF / Fn^{fl/fl} und β B1-CTGF / CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Mäusen (Abb. 25).

3.4 Die Rolle von Fibronektin in der Niere

Im Zusammenhang mit o.g. Experimenten konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutlich erhöhte Mortalitätsrate von Tamoxifen-behandelten CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren verzeichnet werden. Eine genauere Betrachtung der Nieren ließ erkennen, dass die ubiquitäre Deletion von Fibronektin ab dem postnatalen Tag 1 zu auffälligen, pathologischen Veränderungen führt.

3.4.1 Die ubiquitäre Deletion von Fibronektin resultiert in die Entstehung renaler Zysten



Abbildung 26: Makroskopische Aufnahme und HE-Färbung der Nieren von $Fn^{fl/fl}$ und $CAGG-Cre-ER^{TM}/Fn^{fl/fl}$ Tieren nach 5-tägiger Behandlung mit Tamoxifen-Augentropfen

Für die Induktion wurden die Versuchstiere von P 1 bis P 5 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten im Alter von 5-6 Wochen. Makroskopische Aufnahmen (oben), sowie histologische Färbungen der Nieren (unten) dokumentierten eine Zystenbildung in den $CAGG-Cre-ER^{TM}/Fn^{fl/fl}$ Tieren. Maßstabsbalken: 1000 μ m

Sowohl die makroskopischen Aufnahmen (Abb. 26, oben), als auch die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Abb. 26, unten) ließen nach einer ubiquitären Deletion von Fibronektin die Bildung mehrerer renaler Zysten erkennen. Diese waren zum Teil mit Blut, zum Teil mit einer klaren Flüssigkeit gefüllt. Da nach 5-6 Wochen nur noch ein kleiner Teil des intakten Nierenparenchyms erkennbar war, konnte weder die Ursprungsstruktur, noch die genaue Lage der Zysten ermittelt werden. Die pathologischen Veränderungen gingen zudem mit einer Volumenzunahme der Niere

einher (Längsmaß der makroskopischen Aufnahmen: 6652 μm im Kontrolltier vs. 9045 μm im CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tier).

3.4.2 Analyse der Fibronektin Expression in der Niere nach Tamoxifen-induzierter ubiquitärer Deletion

Um zu überprüfen, ob die pathologischen Veränderungen in der Niere von Tamoxifen-behandelten CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren tatsächlich auf einen verminderten renalen Fibronektinspiegel zurückzuführen sind, wurde zunächst mittels quantitativer real-time RT-PCR die mRNA Expression von Fibronektin in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren im Vergleich zu den Fn^{fl/fl} - Geschwistertieren ermittelt. Darüber hinaus wurde anhand von Western Blot Analysen und immunhistochemischer Färbung die renale Fibronektinmenge untersucht.

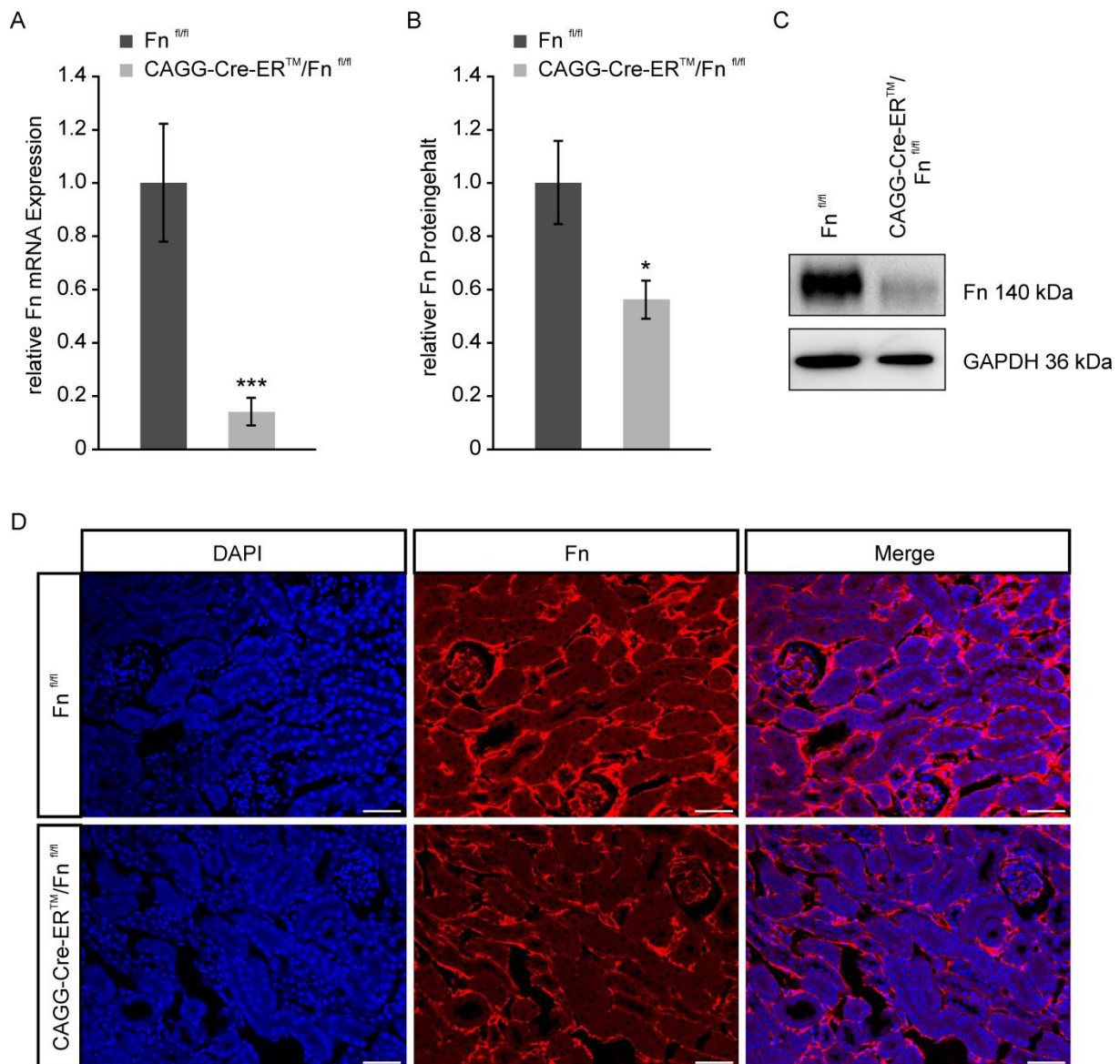


Abbildung 27: Signifikante Reduktion von renalem Fn und seiner mRNA in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren nach Tamoxifen-induzierter Deletion

Für die Induktion wurden die Versuchstiere von P 1 bis P 5 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Isolation der renalen mRNA und Proteine erfolgte im Alter von 5-6 Wochen. (A) Quantitative real-time RT-PCR Analysen zeigten im Vergleich zum Kontrolltier eine höchst signifikante Reduktion der renalen Fn mRNA-Expression in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren. (n = 10, n = 8; Mittelwert ± SEM; ***p<0,005). (B) Die densitometrische Auswertung von Western Blot Analysen bestätigte eine signifikante Abnahme des Fn Gehalts in der Niere von CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren. Zur Normalisierung wurde GAPDH als Ladungskontrolle herangezogen. (n = 13, n = 8; Mittelwert ± SEM; *p<0,05). (C) Repräsentative Western Blot Analyse für renales Fn in Fn^{fl/fl} und CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren. (D) Immunhistochemische Färbungen gegen Fn an Sagittalschnitten der Niere bekräftigten eine Verringerung des Glykoproteins in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren. Maßstabsbalken: 50 µm

Quantitative real-time RT-PCR Analysen zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren eine höchst signifikante Verringerung der renalen Fibronectin mRNA Expression in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren (p<0,005) an (Abb. 27 A).

Zudem ergab die densitometrische Auswertung der Western Blot Untersuchungen eine signifikante Reduktion des Fibronektin Proteingehalts in der Niere von CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Mäusen ($p < 0,05$) (Abb. 27 B)

Immunhistochemische Untersuchungen ließen im Kontrolltier eine deutliche interstitielle Präsenz von Fibronektin erkennen. Darüber hinaus konnte in den Glomeruli ein positives Signal verzeichnet werden. Im Vergleich zu den Fn^{fl/fl} Geschwistertieren war die Intensität der Fibronektin-Färbung in der Niere von CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Mäusen jedoch deutlich abgeschwächt (Abb 27 D).

Zusammenfassend weisen die gewonnenen Daten darauf hin, dass eine 5-tägige Behandlung mit Tamoxifen-Augentropfen in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren zu einer signifikanten Reduktion des Fibronektin-Spiegels in der Niere führt.

3.4.3 Pathologische Veränderungen treten isoliert in der Niere auf

Inwieweit die ubiquitäre Deletion von Fibronektin ab dem postnatalen Tag 1 die Entwicklung bzw. Morphologie verschiedener Organe beeinflusst, wurde anhand einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung analysiert. In diesem Zusammenhang wurde – neben Auge und Niere – das Gewebe von Herz, Lunge, Leber, Darm, Thymus, Milz, Pankreas, Haut, Gehirn und Speicheldrüse (*Glandula submandibularis*) näher betrachtet. Im Folgenden ist das Gewebe von Lunge, Leber, *Glandula submandibularis*, Milz und Thymus von Fn^{fl/fl} und CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren exemplarisch dargestellt.

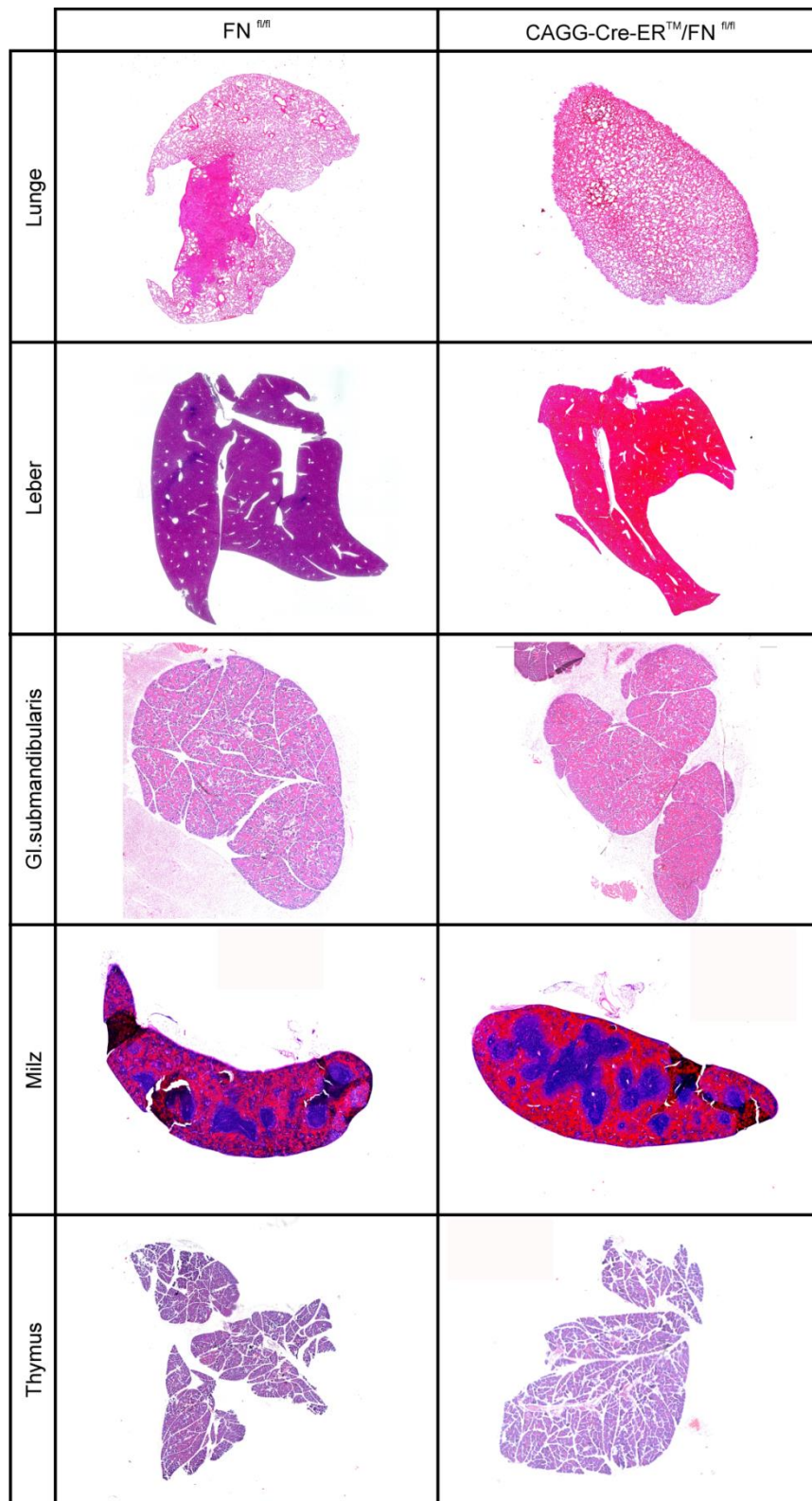


Abbildung 28: HE-Färbung von Lunge, Leber, *Gl.submandibularis*, Milz und Thymus von FN^{fl/fl} und CAGG-Cre-ERTM/FN^{fl/fl} Tieren nach 5-tägiger Behandlung mit Tamoxifen-Augentropfen
 Für die Induktion wurden die Versuchstiere von P 1 bis P 5 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die histologische Untersuchung der verschiedenen Organe erfolgte im Alter von 5-6 Wochen. Repräsentative HE Färbung von Lunge, Leber, *Glandula submandibularis*, Milz und Thymus ließen in den CAGG-Cre-ERTM/FN^{fl/fl} Tieren keinerlei pathologische Veränderungen erkennen.

Anhand von Hämatoxylin-Eosin-Färbungen konnte - mit Ausnahme der Niere – in den CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren keine Anomalie der untersuchten Organe festgestellt werden (Abb. 28).

3.4.4 Analyse der Fibronectin Expression in der Leber nach Tamoxifen-induzierter ubiquitärer Deletion

Die Hepatozyten der Leber gelten als der Syntheseort des Plasma-Fibronectins (Tamkun & Hynes, 1983). Darüber hinaus weisen Studien darauf hin, dass Plasma-Fibronectin in die extrazelluläre Matrix verschiedenster Organe – unter anderem der Niere – integriert werden kann (Oh et al. 1981). Um zu untersuchen, inwieweit die Fibronectinbiosynthese in der Leber durch die Tamoxifen-induzierte Deletion beeinflusst wird, wurde die Menge an Fibronectin anhand quantitativer real-time RT-PCR Analysen und immunhistochemischer Färbung ermittelt.

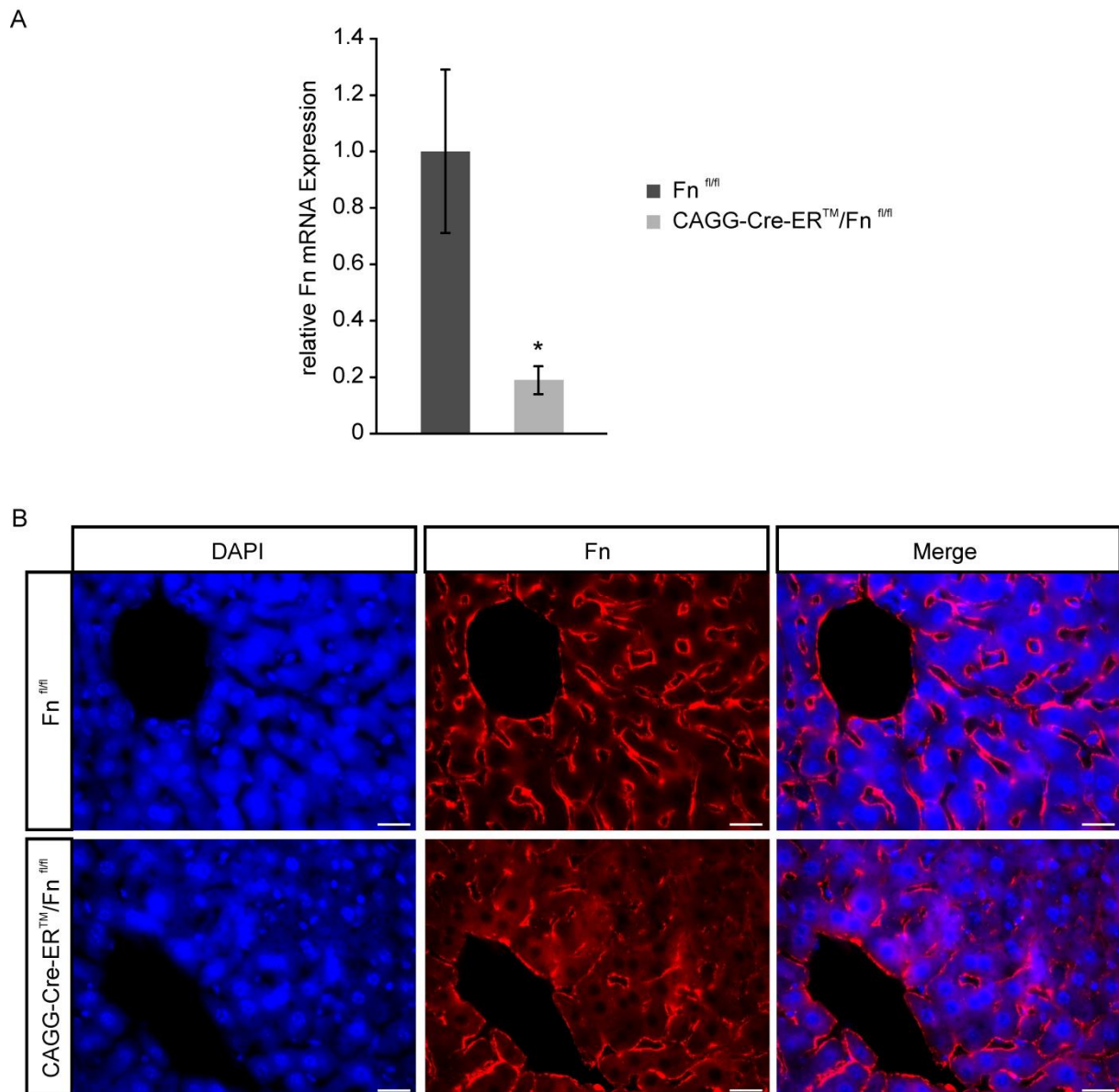


Abbildung 29: Reduktion von Fn und seiner mRNA in der Leber von CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren nach Tamoxifen-induzierter Deletion

Für die Induktion wurden die Versuchstiere von P 1 bis P 5 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Isolation des Gewebes erfolgte im Alter von 5-6 Wochen. (A) Quantitative real-time RT-PCR Analysen zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion der Fn mRNA-Expression in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren an (n = 4; Mittelwert ± SEM; *p<0,05). (B) Immunhistochemische Färbungen gegen Fn an Sagittalschnitten der Leber wiesen auf eine verringerte Menge in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren hin. Maßstabsbalken: 20 µm

Quantitative real-time RT-PCR Untersuchungen der Leber ließen - im Vergleich zur Kontrollgruppe - in den CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren eine signifikante Reduktion der Fibronektin mRNA Expression erkennen (p<0,05) (Abb. 29 A).

Die immunhistochemischen Analysen in den Kontrolltieren dokumentierten in der Leber eine sinusoidal angeordnete Färbung für Fibronektin. Diese wirkte in den CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren vergleichsweise abgeschwächt (Abb. 29 B).

3.4.5 Renale Zysten expandieren mit zunehmendem Alter

Um auf die gradielle Entwicklung der renalen Zysten schließen zu können, wurden die Versuchstiere ab dem postnatalen Tag 1 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen behandelt und die Nieren entweder 3, 4, 8 oder 14 Tage nach Induktionsbeginn mittels einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung histologisch untersucht. Hierbei erhielten Tiere, deren renale Veränderungen bereits an P 3 und P 4 genauer betrachtet wurden, eine 2-tägige Tamoxifen-Behandlung, während sich die Induktionsdauer für die restlichen Versuchstiere auf einen Zeitraum von 5 Tagen erstreckte.

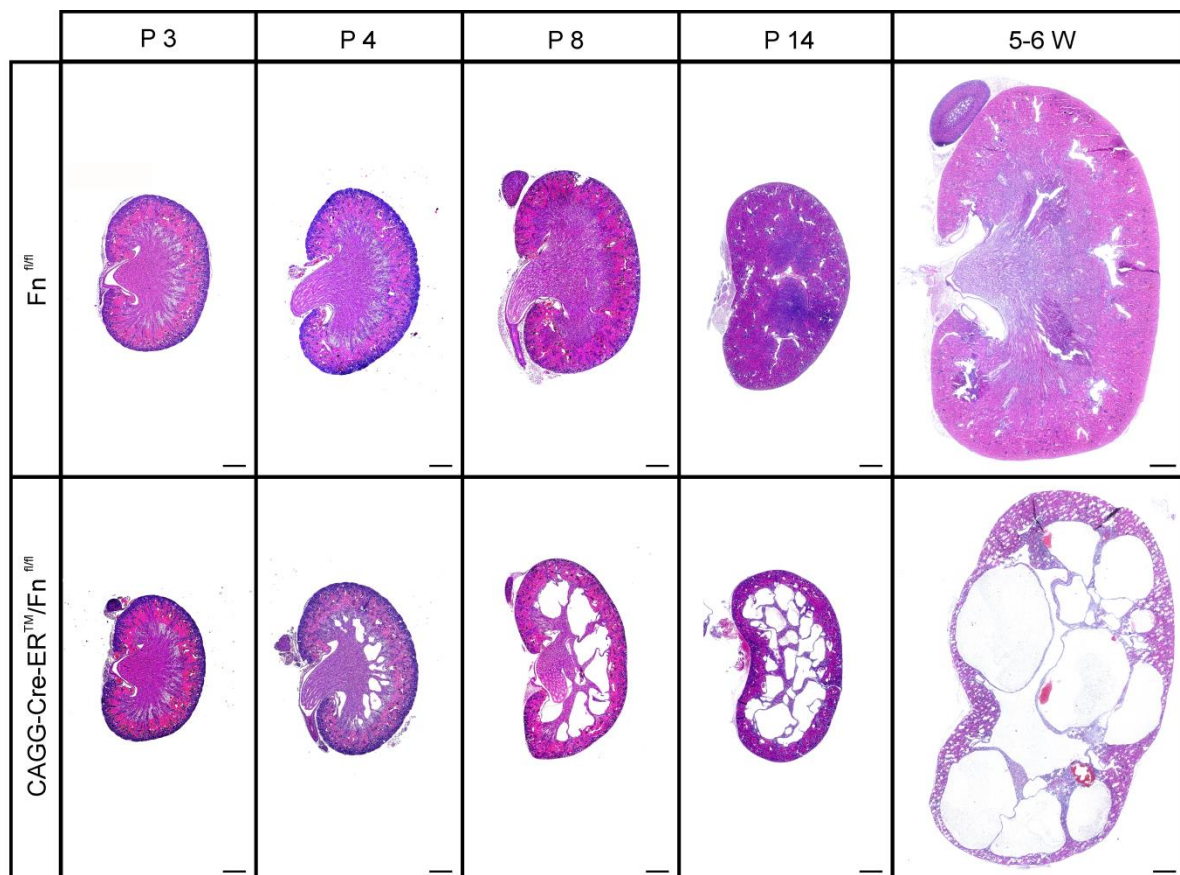


Abbildung 30: Progressiver Verlauf der renalen Zystenbildung nach Tamoxifen-induzierter Deletion von Fn

Für die Induktion wurden die Versuchstiere ab P 1 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die histologischen Untersuchungen der Nieren erfolgten im Alter von 3, 4, 8, 14 Tagen bzw. 5-6 Wochen. Repräsentative HE-Färbungen wiesen auf eine positive Korrelation zwischen dem Alter der Tiere und der Größe und/oder Anzahl von Zysten hin. Maßstabsbalken: 500 µm

Die histologischen Untersuchungen zeigten, dass am postnatalen Tag 3 in der Niere von CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Mäusen noch keine pathologischen Veränderungen sichtbar waren. Bereits 24 Stunden später (P 4) traten in Tieren mit einer Deletion von Fibronektin erste Zysten auf, wobei diese v.a. im Übergangsbereich zwischen Kortex und Medulla lokalisiert waren. Mit zunehmendem Alter vergrößerten sich die Zysten und bereits am postnatalen Tag 8 ergab sich der Eindruck, dass diese das noch intakte Nierengewebe mehr und mehr verdrängten. Diese Vermutung bestätigte sich mit fortschreitender Beobachtungsdauer. 5-6 Wochen nach Induktionsbeginn war meist der Großteil des Nierengewebes zerstört (Abb. 30).

Alles in allem kann festgehalten werden, dass die Zysten – ausgehend von der Medulla-Kortex-Grenze – mit zunehmendem Alter expandieren und das intakte Nierengewebe mehr und mehr verdrängen.

3.4.6 Analyse der renalen Fibronektin Expression am postnatalen Tag 4

Die Untersuchungen zum progressiven Verlauf der Zystenerkrankung in der Niere (Abb. 30) ließen erkennen, dass bereits am vierten Tag nach Beginn der Tamoxifen-Behandlung erste Zysten an der Medulla-Kortex-Grenze auftreten. Um zu überprüfen, ob diese frühen Veränderungen tatsächlich auf einen Mangel an renalem Fibronektin zurückzuführen sind, wurde mittels quantitativer real-time RT-PCR bzw. immunhistochemischer Färbung die Menge von Fibronektin und seiner mRNA in den CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt.

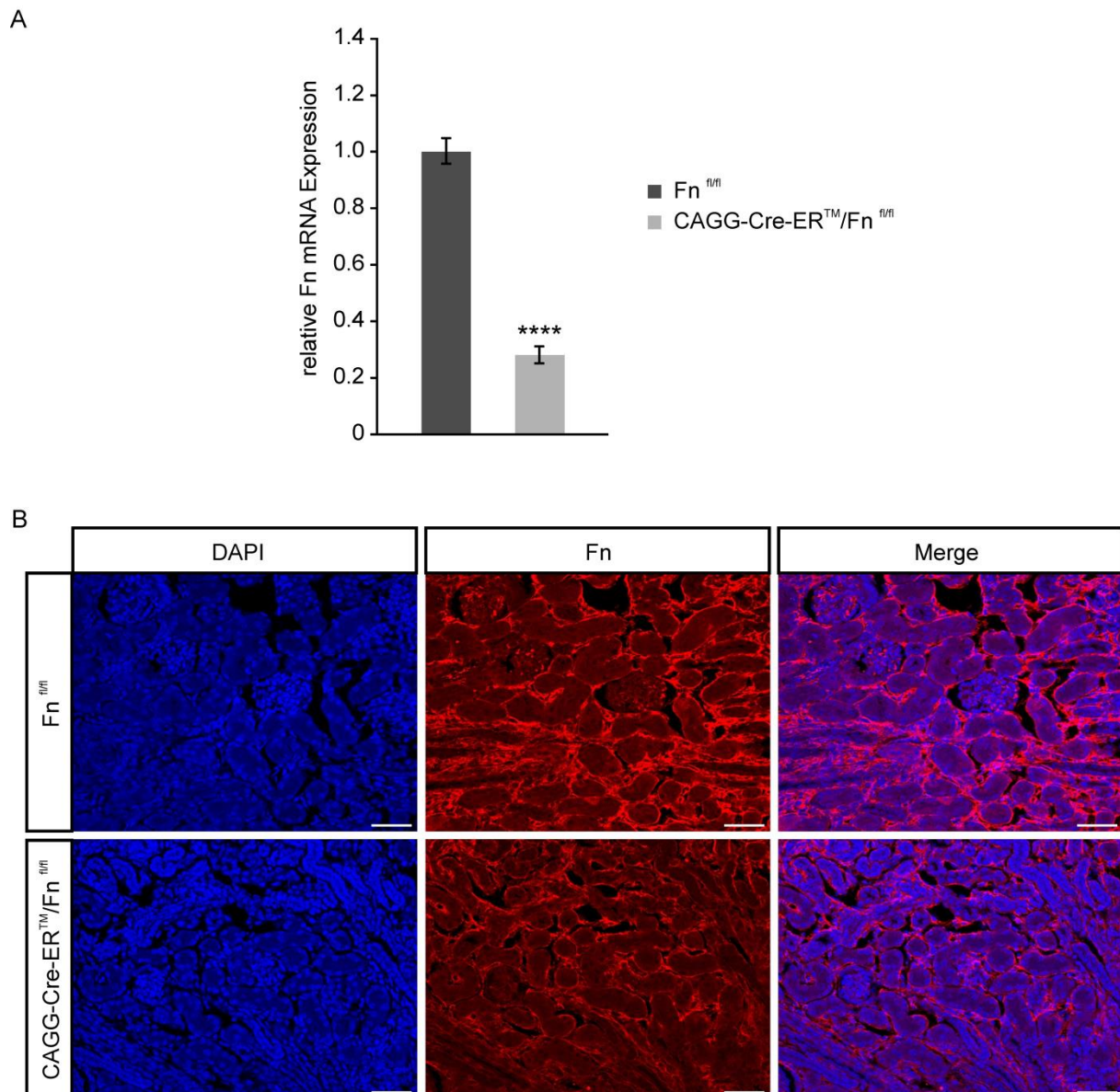


Abbildung 31: Signifikante Reduktion der mRNA und moderat verringertes renales Fn in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren an P 4 nach Tamoxifen-induzierter Deletion

Für die Induktion wurden die Versuchstiere an P 1 und P 2 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Isolation des Gewebes erfolgte an P 4. (A) Quantitative real-time RT-PCR Analysen zeigten eine höchst signifikante Reduktion der Fn mRNA-Expression in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren (n = 4, n = 7; Mittelwert ± SEM; ****p<0,001). (B) Immunhistochemische Färbungen gegen Fn an Sagittalschnitten der Niere bekräftigten im Vergleich zum Kontrolltier eine moderate Verringerung der Fn Menge in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren. Maßstabsbalken: 50 µm

Mittels quantitativer real-time RT-PCR Analyse konnte am postnatalen Tag 4 eine höchst signifikante Reduktion der renalen Fibronectin mRNA Expression um ca. 70% nachgewiesen werden (Abb. 31 A).

Die immunhistochemischen Färbungen an Sagittalschnitten der Niere ließen im Vergleich zum Kontrolltier auf einen moderaten Rückgang von Fibronectin in den CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren schließen (Abb. 31 B).

3.4.7 Analyse der renalen Fibronektin Expression am postnatalen Tag 8

Abbildung 30 macht deutlich, dass – im Vergleich zu P 4 - am postnatalen Tag 8 die pathologischen Veränderungen in der Niere schon sehr weit fortgeschritten waren. Um zu untersuchen, ob die Ausdehnung der Zysten in Zusammenhang mit einer zunehmenden – zeitlich bedingten - Verminderung des Fibronektinlevels steht, wurde am postnatalen Tag 8 ebenfalls der renale mRNA- und Proteinlevel ermittelt.

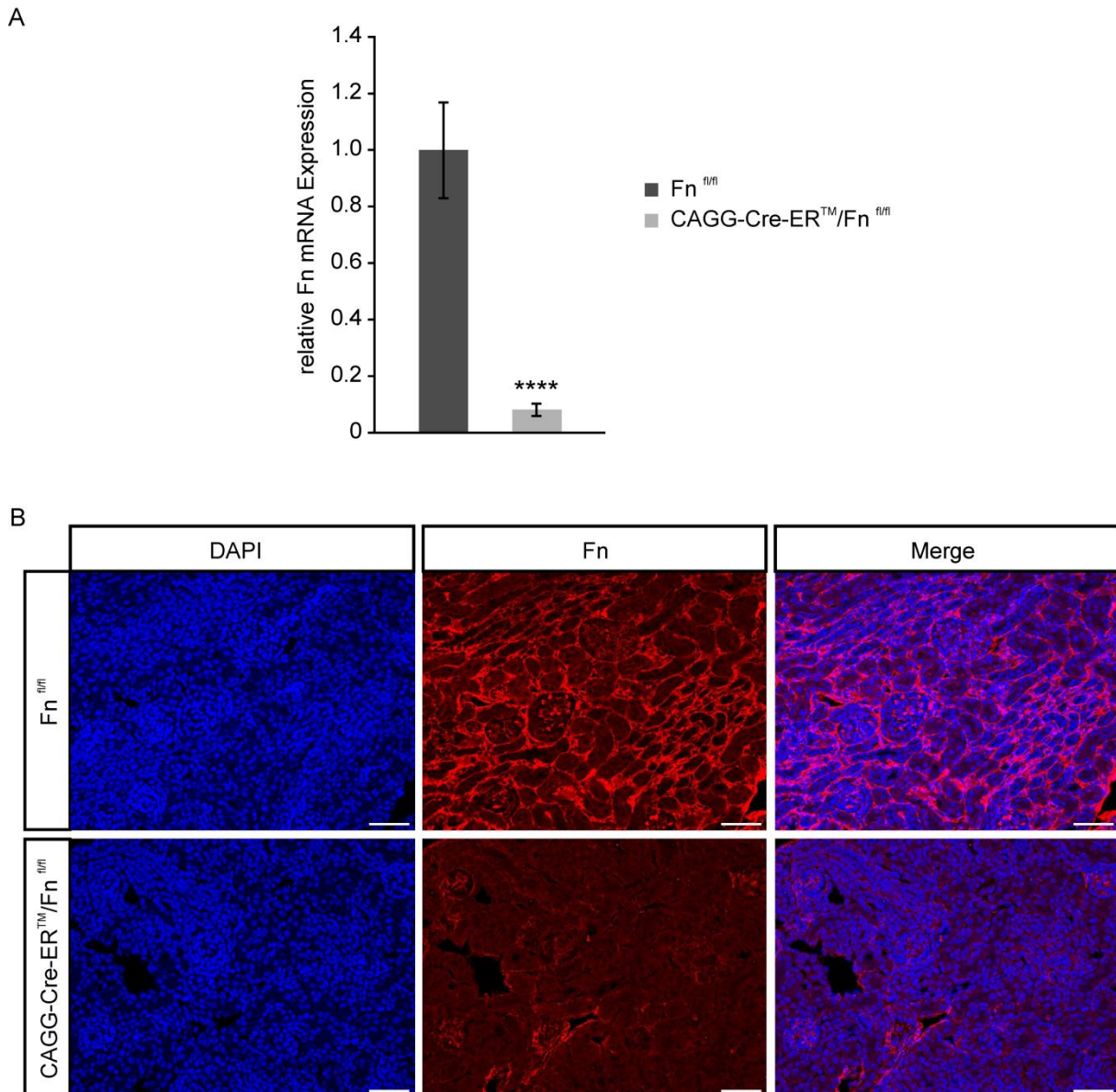


Abbildung 32: Signifikante Reduktion von Fibronektin und seiner mRNA in der Niere von CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren nach Tamoxifen-induzierter Deletion (P 8)

Für die Induktion wurden die Versuchstiere von P 1 bis P 5 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Isolation des Gewebes erfolgte an P 8. (A) Quantitative real-time RT-PCR Analysen zeigten eine höchst signifikante Reduktion der Fn mRNA-Expression in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren auf (n = 8, n = 9; Mittelwert ± SEM; ****p<0,001). (B) Immunhistochemische Färbungen gegen Fn an Sagittalschnitten der Niere dokumentierten im Vergleich zum Kontrolltier eine deutliche Abnahme der Fn Menge in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren. Maßstabsbalken: 50 µm

Quantitative real-time RT-PCR Analysen belegten eine Woche nach Beginn der postnatalen Tamoxifen-Behandlung in den CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren eine im Vergleich zum Kontrolltier um ca. 90 % verminderte renale Fibronektin mRNA Expression ($p < 0,001$) (Abb. 32 A).

Darüber hinaus konnte anhand immunhistochemischer Untersuchungen eine klare Verringerung des Fibronektingehalts in den CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren beobachtet werden (Abb. 32 B).

Insgesamt gesehen war sowohl die mRNA-, als auch die Proteinmenge am postnatalen Tag 8 in den CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren wesentlich stärker reguliert als dies am postnatalen Tag 4 der Fall war.

3.4.8 Renale Zysten in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Mäusen resultieren aus einer Aufweitung des Interstitiums

3.4.8.1 Histologische Untersuchungen

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass die ubiquitäre postnatale Deletion von Fibronektin mit einer Bildung von renalen Zysten einhergeht, stellte sich die Frage, aus welcher Gewebestruktur diese entstehen.

Um dies zu untersuchen, wurden zunächst Semidünnschnitte von pathologischen Nieren angefertigt, diese mittels einer Färbung nach Richardson angefärbt und das Gewebe entlang der Zysten genauer betrachtet.

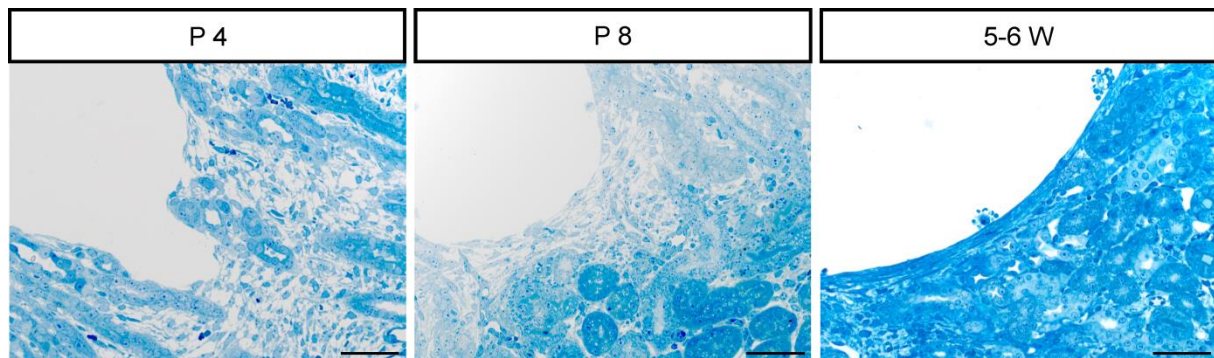


Abbildung 33: Semidünnschnitte zystischer Nieren nach Tamoxifen-induzierter Deletion von Fn
Für die Induktion wurden die Versuchstiere ab postnatalem Tag 1 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten im Alter von 4 bzw. 8 Tagen und 5-6 Wochen. Histologische Färbeverfahren nach Richardson wiesen 4 bzw. 8 Tage nach Induktionsbeginn eine Lockerung des interstitiellen Gewebes auf, während nach 5-6 Wochen die Zysten von einem Epithel umschlossen zu sein schienen. Maßstabsbalken: 50 µm

Die Untersuchungen am postnatalen Tag 4 und 8 ließen eine deutliche Lockerung des interstitiellen Gewebes entlang der Zysten erkennen. Während am postnatalen Tag 4 längs der Zyste sowohl interstitielle Zellen, als auch tubuläre Strukturen lokalisiert waren (Abb. 33, links), zeichnete sich am postnatalen Tag 8 eine strukturierte Anordnung interstitieller Zellen zwischen Zyste und Nierengewebe ab (Abb. 33, mittig). Im Alter von 5-6 Wochen war die Zyste von einem epithel-ähnlichem Gewebe umgeben, das eine klare Abgrenzung zum noch intakten Gewebe vermuten ließ (Abb. 33, rechts).

3.4.8.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für eine noch detailliertere Analyse des betroffenen Gewebeabschnitts wurden zudem elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

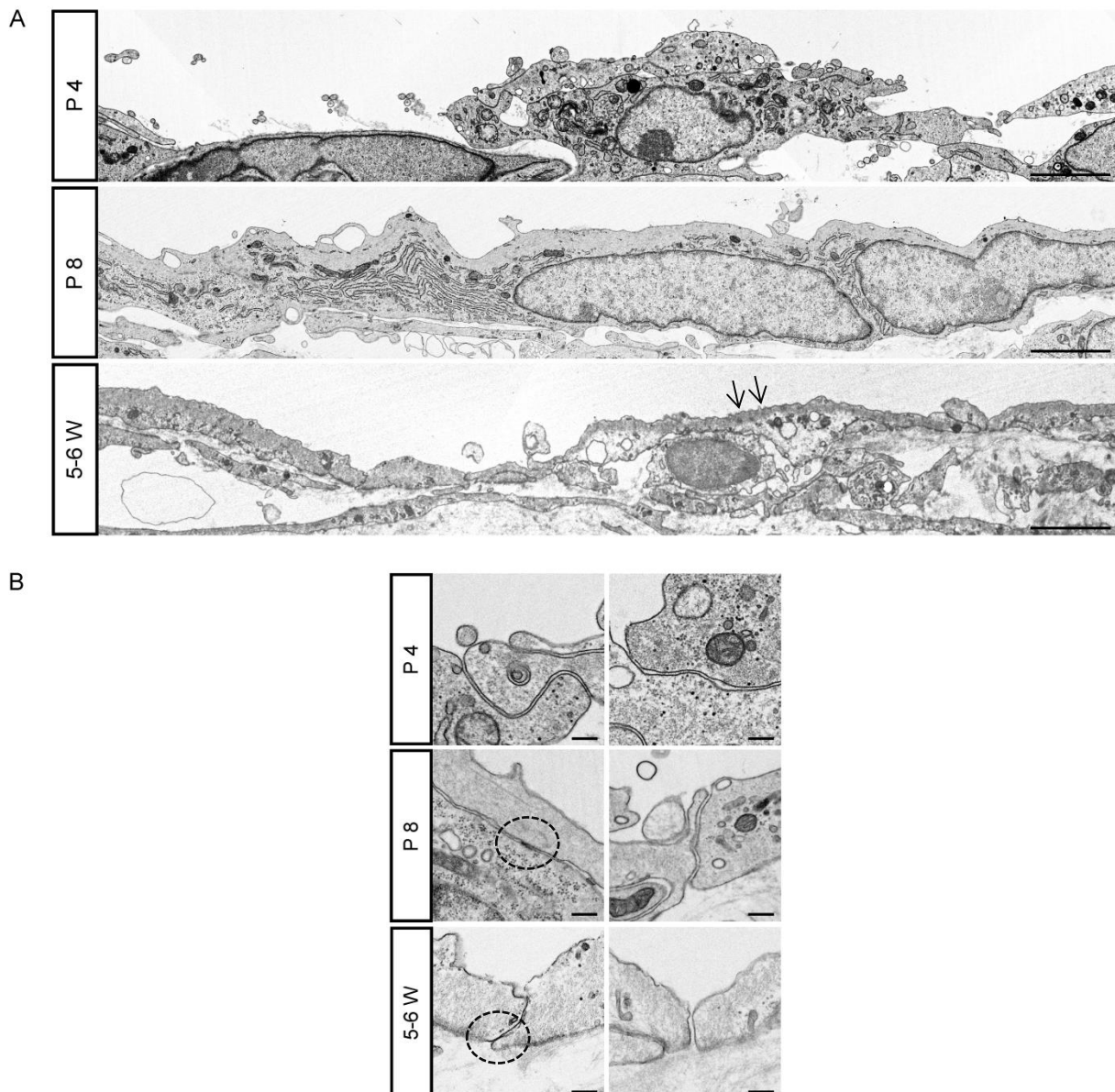


Abbildung 34: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Zystenbegrenzung

Für die Induktion wurden die Versuchstiere ab P 1 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten im Alter von 4 bzw. 8 Tagen und 5-6 Wochen. (A) Ausschnitt eines Gewebebereichs entlang der Zyste. Die Zellen längs der Zyste zeigten keine gewebespezifischen morphologischen Merkmale. Maßstabsbalken: 3 μ m (B) Exemplarische Kommunikationseinheiten zwischen Zellen. Im Gegensatz zu P 4, war an P 8 bzw. 5-6 Wochen nach Induktionsbeginn teilweise eine direkte Verknüpfung der Zellen erkennbar. Maßstabsbalken: 250 nm

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen ließen am postnatalen Tag 4 eine lockere Anordnung von Zellen entlang der entstehenden Zyste erkennen. Diese wiesen keine spezifischen morphologischen Merkmale auf, sodass keine eindeutige Zuordnung zu einem speziellen Gewebetyp möglich war (Abb. 34 A, oben). Zwischen den einzelnen Zellen war zu diesem Zeitpunkt keine direkte Verbindung zu beobachten (Abb. 34 B, oben).

Am postnatalen Tag 8 bzw. 5-6 Wochen nach Induktionsbeginn erschienen die Zellen längs der Zyste abgeflacht, länglich und epithel-ähnlich angeordnet (Abb. 34 A, mittig bzw. unten). Darüber hinaus war eine direkte Verknüpfung zwischen einzelnen Zellen erkennbar (Abb. 34 B, kreisförmige Markierungen). Eben diese konnten jedoch nur teilweise und nicht - wie z.B. bei einem Epithel - durchgehend beobachtet werden. Auffällig war auch, dass im Alter von 5-6 Wochen z.T. eine erhöhte Menge an 5-6 nm dicken Aktinfilamenten entlang der Zystenbegrenzung auftrat (Abb. 34 A, unten, Pfeile). Alles in allem war jedoch auch in diesem Stadium der Zystenbildung keine eindeutige Zuordnung zu einem speziellen Gewebetypus aufgrund morphologischer Merkmale möglich.

Schlussendlich ermöglichten die histologischen und elektronenmikroskopischen Nachforschungen *per se* keine eindeutige Interpretation bezüglich des geschädigten Gewebes, das zur Bildung der renalen Zysten führt.

Aus diesem Grunde wurden sagittale Schnitte der Niere angefertigt und immunhistochemisch gegen spezifische Marker verschiedener renaler Gewebearten gefärbt. Da eine De-differenzierung von Zellen zu einem Verlust spezifischer Marker führen und somit ein falsch negatives Ergebnis liefern könnte, wurden die Untersuchungen nicht nur im Alter von 5-6 Wochen, sondern auch am postnatalen Tag 4 und 8 durchgeführt.

3.4.8.3 Renale Zysten resultieren nicht aus einer Erweiterung von Blutgefäßen oder des Tubulus- und Sammelrohrsystems

Um zu überprüfen, ob die entstandenen pathologischen Veränderungen auf eine Expansion von Blutgefäßen oder eine Aufweitung des Tubulus- bzw. Sammelrohrsystems zurückzuführen sind, wurden im Folgenden Gewebeschnitte immunhistochemisch gegen CD 31 (Endothelzellen), Calbindin (distaler Tubulus), Megalin (proximaler Tubulus) und Aquaporin-2 (Sammelrohr) gefärbt.

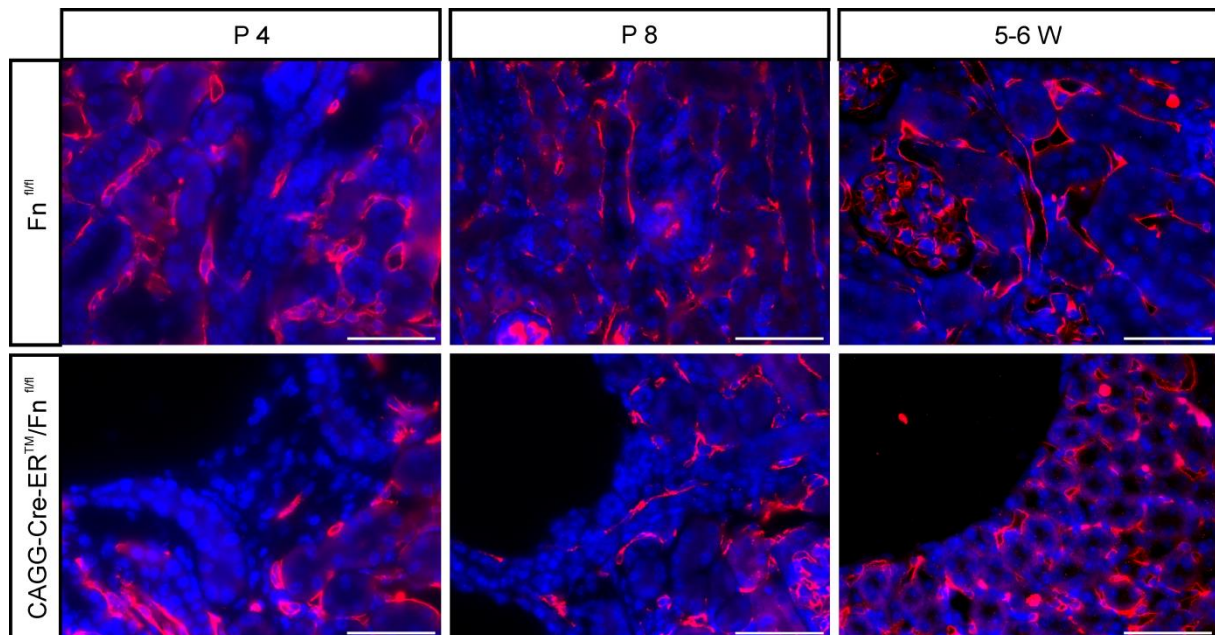


Abbildung 35: Zysten resultieren nicht aus einer Erweiterung von Blutgefäßen

Für die Induktion wurden die Versuchstiere ab P 1 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten im Alter von 4 bzw. 8 Tagen und 5-6 Wochen. Immunhistochemische Färbungen von sagittalen Schnitten der Niere ergaben zu keinem Zeitpunkt eine positive Expression für CD 31 in den Zellen ringsum die Zyste. rot = CD 31, blau = DAPI; Maßstabsbalken: 50 µm

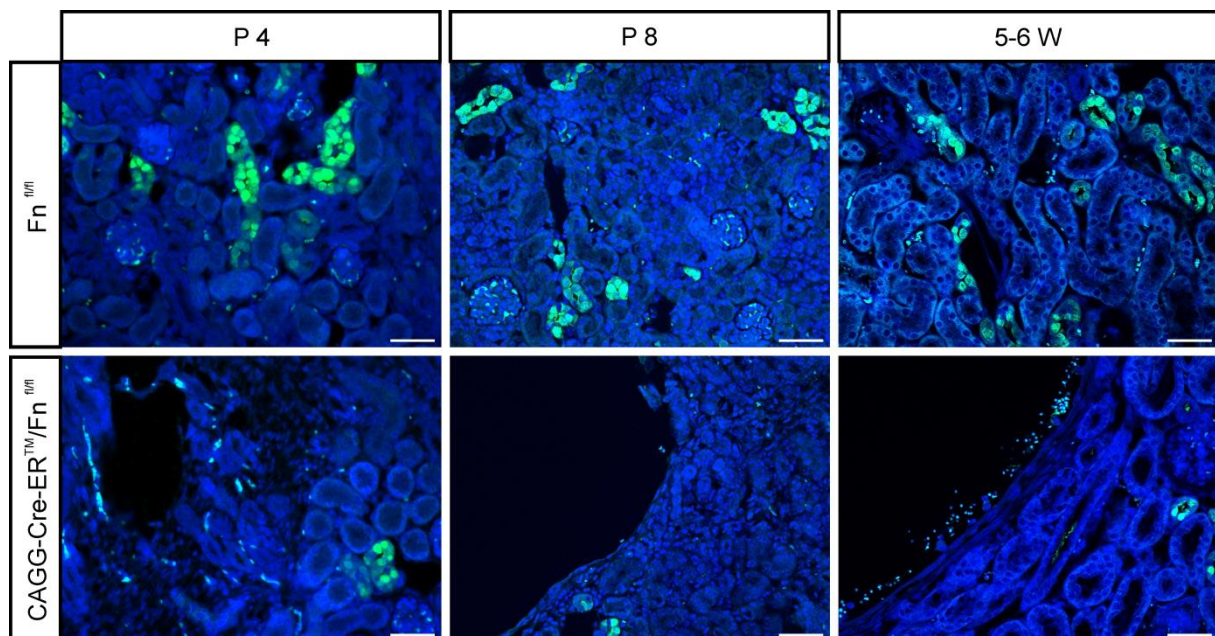


Abbildung 36: Zysten entstehen nicht aufgrund einer Aufweitung distaler Tubuli

Für die Induktion wurden die Versuchstiere ab P 1 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten im Alter von 4 bzw. 8 Tagen und 5-6 Wochen. Immunhistochemische Färbungen von sagittalen Schnitten der Niere ergaben zu keinem Zeitpunkt eine positive Expression für Calbindin in den Zellen ringsum die Zyste. grün = Calbindin, blau = DAPI; Maßstabsbalken: 50 µm

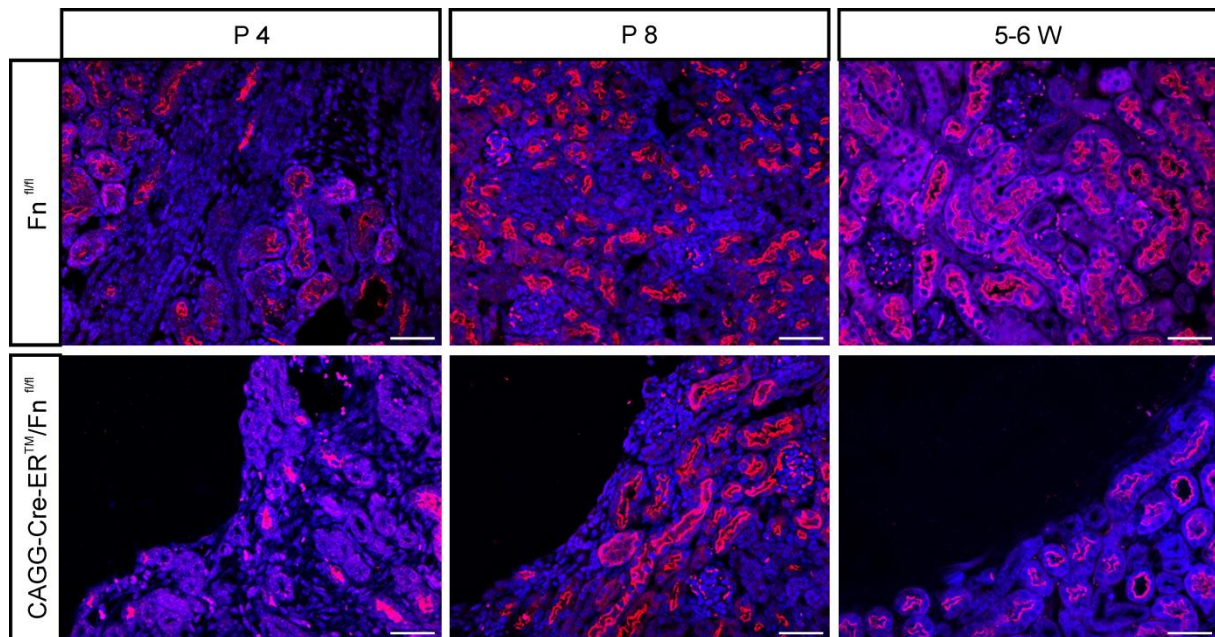


Abbildung 37: Zysten resultieren nicht aus einer Weitung proximaler Tubuli

Für die Induktion wurden die Versuchstiere ab P 1 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten im Alter von 4 bzw. 8 Tagen und 5-6 Wochen. Immunhistochemische Färbungen von sagittalen Schnitten der Niere dokumentierten zu keinem Zeitpunkt eine positives Signal für Megalin in den Zellen ringsum die Zyste. rot = Megalin, blau = DAPI; Maßstabsbalken: 50 µm

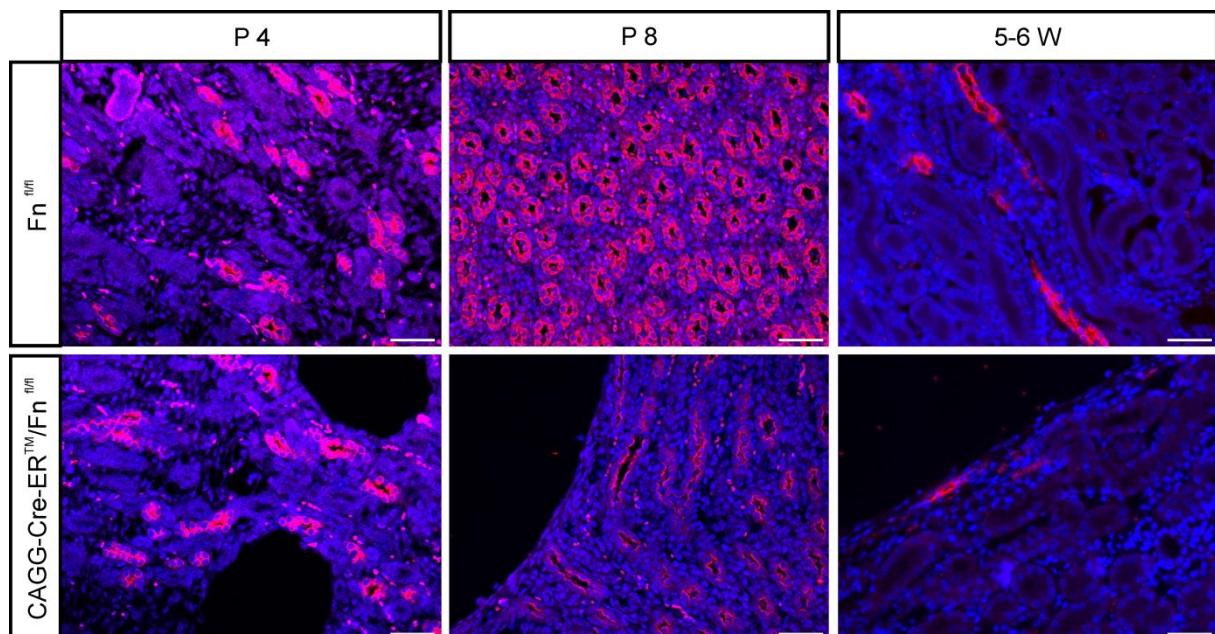


Abbildung 38: Zysten entstehen nicht aufgrund einer Aufweitung des Sammelrohrsystems

Für die Induktion wurden die Versuchstiere ab P 1 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten im Alter von 4 bzw. 8 Tagen und 5-6 Wochen. Immunhistochemische Färbungen von sagittalen Schnitten der Niere ergaben zu keinem Zeitpunkt eine positive Färbung für Aquaporin-2 in den Zellen ringsum die Zyste. rot = Aquaporin-2, blau = DAPI; Maßstabsbalken: 50 µm

Die immunhistochemischen Färbungen gegen CD 31, Calbindin, Megalin und Aquaporin-2 ließen sowohl in den $Fn^{fl/fl}$ Mäusen, als auch in den CAGG-Cre-ERTM / $Fn^{fl/fl}$ Tieren eine deutliche Färbung der entsprechenden Gewebestruktur erkennen. Für die an die Zyste angrenzenden Zellen ergab sich jedoch zu keinem der betrachteten Zeitpunkte ein positives Signal (Abb. 35 – 38).

3.4.8.4 Renale Zysten resultieren aus einer Auflockerung des interstitiellen Gewebes

Inwieweit die Anomalien in der Niere mit einer Auflockerung des interstitiellen Gewebes korrelieren, wurde anhand einer Färbung gegen PDGFR- β untersucht.

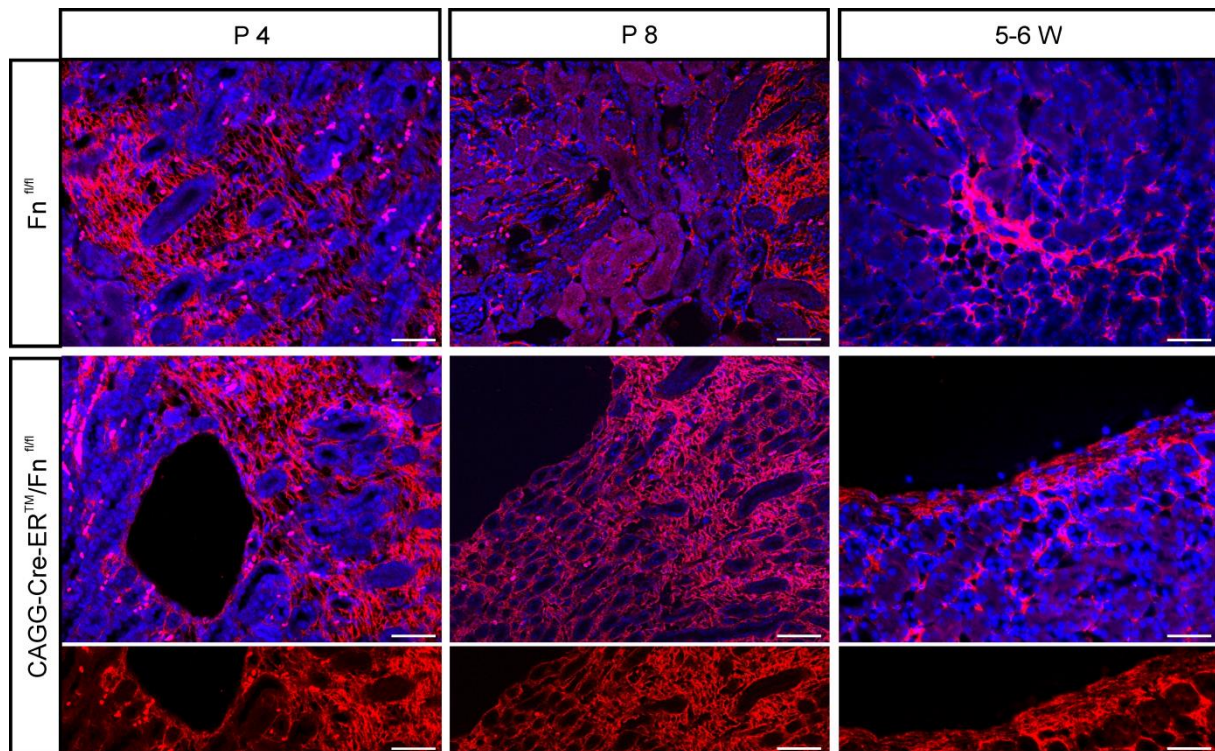


Abbildung 39: Renale Zysten entstehen aufgrund einer Auflockerung von interstitiellem Gewebe

Für die Induktion wurden die Versuchstiere ab P 1 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten im Alter von 4 bzw. 8 Tagen und 5-6 Wochen. Immunhistochemische Färbungen von sagittalen Schnitten der Niere gegen PDGFR- β dokumentierten zu allen Beobachtungszeitpunkten eine positive Expression entlang der Zystenwandung. Rot = PDGFR- β , blau = DAPI; Maßstabsbalken: 50 μ m

Die immunhistochemischen Analysen bezüglich PDGFR- β ließen eine Expression des Rezeptors im interstitiellen Gewebe beider untersuchten Gruppen erkennen.

Darüber hinaus war sowohl am postnatalen Tag 4 und 8, als auch im Alter von 5-6 Wochen in den CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren die Abgrenzung zur Zyste hin positiv angefärbt (Abb. 39).

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die nach einer Deletion von Fibronectin auftretende Zystenbildung mit einer Auflockerung des interstitiellen Gewebes in Verbindung steht.

3.4.9 Die pathologischen Veränderungen in der Niere führen zu keiner Epithelialisierung des defekten Gewebes

Trotz der oben genannten Befunde erschienen die Zellen entlang der Zystenwandung ab dem postnatalen Tag 8 strukturiert angeordnet. 5-6 Wochen nach Induktionsbeginn war zudem eine epithel-ähnliche Abgrenzung der Zyste vom restlichen Nierengewebe zu erkennen (Abb. 33).

Um zu klären, ob die nach einer Deletion von Fibronectin auftretenden Nierenschädigungen eine Epithelialisierung des zerstörten Gewebes nach sich ziehen, wurden die ringsum die Zyste auftretenden Zellen auf typische Marker für Epithelzellen getestet. Epithelien zeichnen sich zum einen durch Polarität und – damit verbunden – dem Auftreten einer Basalmembran, zum anderen durch das Vorhandensein von Zellkontakten aus. Im Folgenden wurden diese Aspekte mittels immunhistochemischer Färbungen gegen E-Cadherin, Kollagen IV und Laminin untersucht.

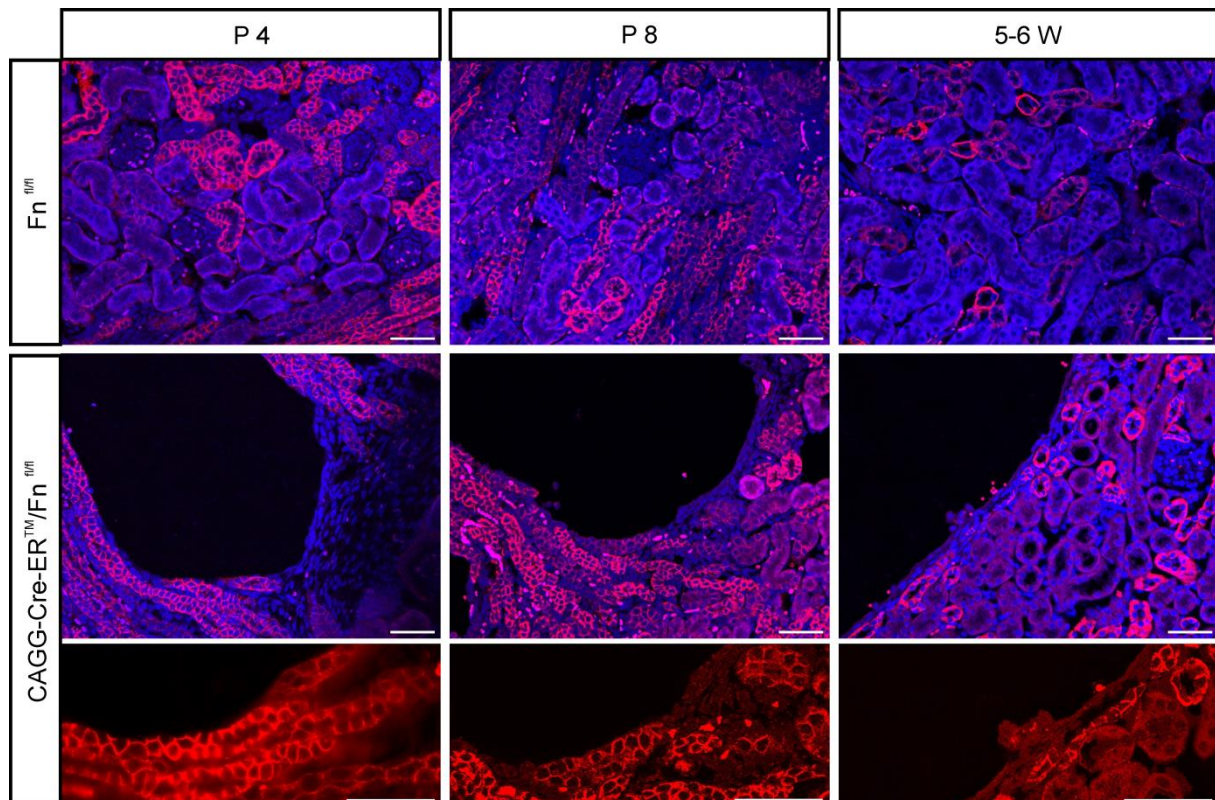


Abbildung 40: Zellen renaler Zysten zeigen keine E-Cadherin spezifische Zell-Zell-Verknüpfung
 Für die Induktion wurden die Versuchstiere ab P 1 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten im Alter von 4 bzw. 8 Tagen und 5-6 Wochen. Immunhistochemische Färbungen von sagittalen Schnitten der Niere gegen E-Cadherin dokumentierten keine Zell-Zell-Kontakte zwischen den an die Zyste angrenzenden Zellen. Die unterste Reihe zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der Zystenbegrenzung. Rot = E-Cadherin, blau = DAPI; Maßstabsbalken: 50 µm

Die immunhistochemischen Untersuchungen gegen E-Cadherin zeigten eine Präsenz des Proteins in den Nierentubuli und Sammelrohren an, wobei – übereinstimmend mit vorangegangenen Studien (Prozialeck et al. 2004) – die Ausprägung in den proximalen Tubuli erheblich schwächer erschien. Nichtsdestotrotz konnte weder am postnatalen Tag 4 bzw. 8, noch 5-6 Wochen nach Induktionsbeginn ein durchgehendes positives Signal für E-Cadherin entlang der Zystenabgrenzung verzeichnet werden. Zwar war am Rand der Zysten zum Teil eine Färbung vorhanden, doch ließ diese sich bei genauerer Betrachtung (unterste Reihe) auf die angrenzenden Tubuli zurückführen (Abb. 40).

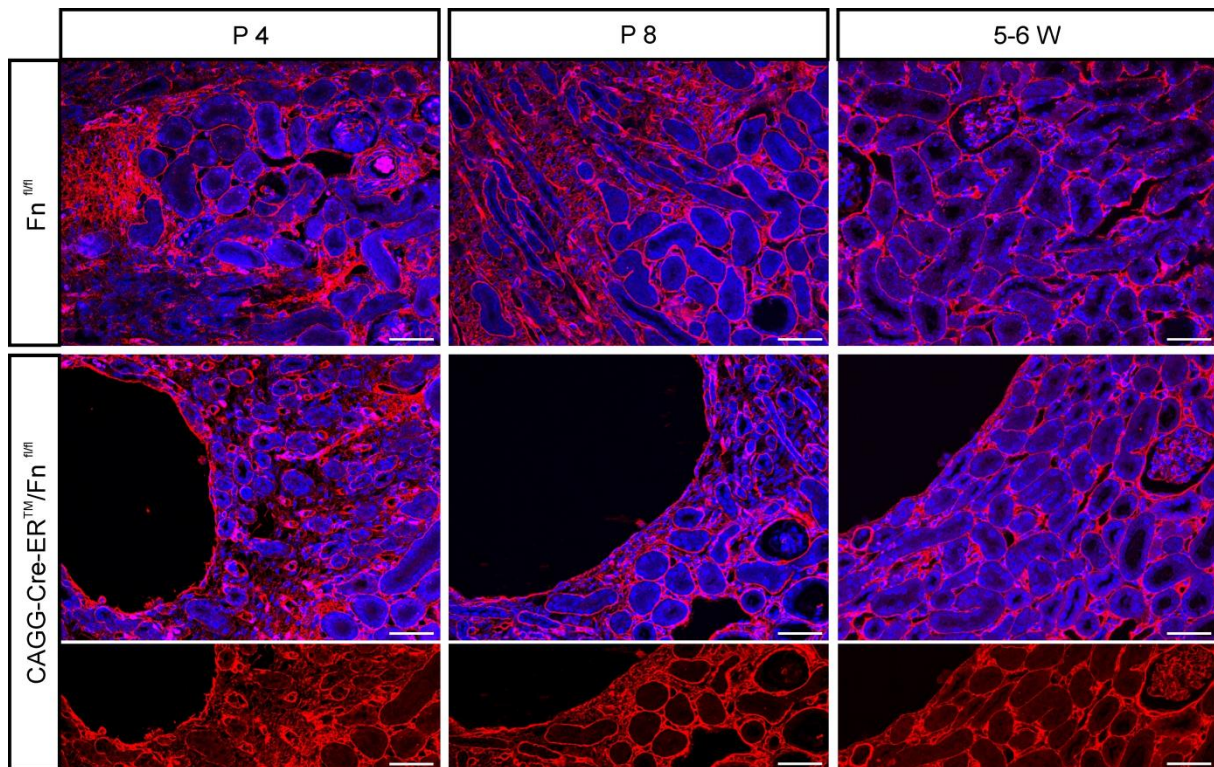


Abbildung 41: Zellen renaler Zysten zeigen keine Basallamina-spezifische Präsenz von Kollagen IV

Für die Induktion wurden die Versuchstiere ab P 1 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten im Alter von 4 bzw. 8 Tagen und 5-6 Wochen. Immunhistochemische Färbungen von sagittalen Schnitten der Niere gegen Kollagen IV dokumentierten entlang der Zysten keine Basallamina-spezifische Färbung. Die unterste Reihe zeigt einen Ausschnitt der Zystenbegrenzung. Rot = Kollagen IV, blau = DAPI; Maßstabsbalken: 50 µm

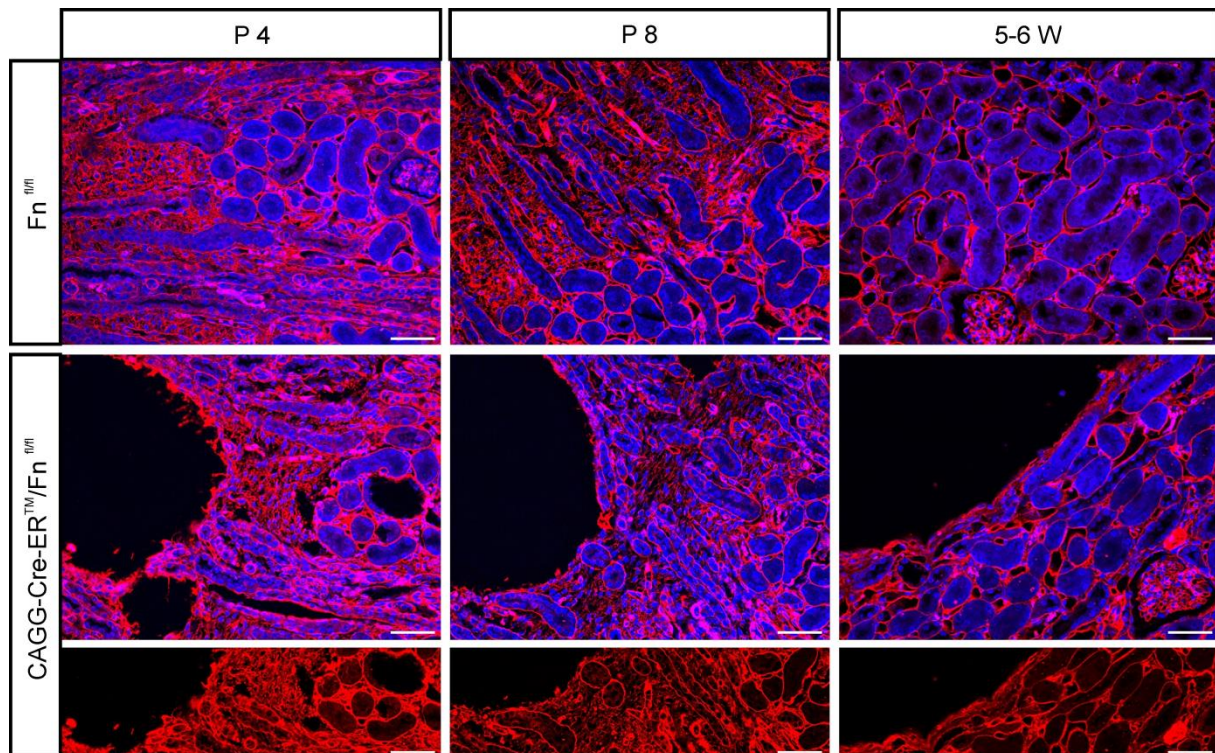


Abbildung 42: Zellen renaler Zysten zeigen keine Basallamina-spezifische Präsenz von Laminin
 Für die Induktion wurden die Versuchstiere ab P 1 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten im Alter von 4 bzw. 8 Tagen und 5-6 Wochen. Immunhistochemische Färbungen von sagittalen Schnitten der Niere gegen Laminin dokumentierten entlang der Zysten keine typische Färbung für die Basalmembran. Die unterste Reihe zeigt einen Ausschnitt der Zystenbegrenzung. Rot = Laminin, blau = DAPI Maßstabsbalken: 50 µm

Bezugnehmend auf die immunhistochemische Kollagen IV und Laminin Analyse war sowohl die tubuläre, als auch die glomeruläre Basallamina deutlich gegen die interstitielle Präsenz der Proteine abgegrenzt. Das Vorkommen im renalen Interstitium äußerte sich in einer typisch fibrillären Färbung. Zwar war längs der Zyste zu allen beobachteten Zeitpunkten ein positives Signal für Kollagen IV erkennbar, doch glich die Färbung bezüglich Intensität und Erscheinungsmuster im direkten Vergleich eher dem interstitiellen Typ (Abb. 41). Die immunhistochemische Untersuchung gegen Laminin bestätigte diesen Befund (Abb. 42).

3.4.10 Fibronektin und Fibrose

Eine häufige Begleiterscheinung der Schädigung von Nierengewebe ist die Entstehung einer Fibrose. Diese ist weitestgehend durch eine pathologische Vermehrung von Kollagenfasern gekennzeichnet. Zudem kommt es zu einer

gesteigerten Aktivität von Myofibroblasten und damit einhergehend häufig auch zu einer erhöhten Menge an renalem α -SMA (Duffield 2014).

Um zu überprüfen, ob die mit der Deletion von Fibronectin einhergehenden pathologischen Veränderungen ebenfalls zu einer Nierenfibrose führen, wurden die Nieren auf o.g. Charakteristika hin untersucht. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf das an die Zyste angrenzende Gewebe gelegt.

3.4.10.1 Die Deletion von Fibronectin resultiert langfristig in einer Akkumulation von Kollagen ringsum die Zysten

Die mögliche Akkumulation von Kollagenfasern – insbesondere des Typs I und III - wurde anhand einer Picro-Siriusrot-Färbung aufgeklärt. Die Überprüfung der mRNA-Expression dieser beiden Kollagene in der Gesamtniere erfolgte mittels quantitativer real-time RT-PCR Analysen.

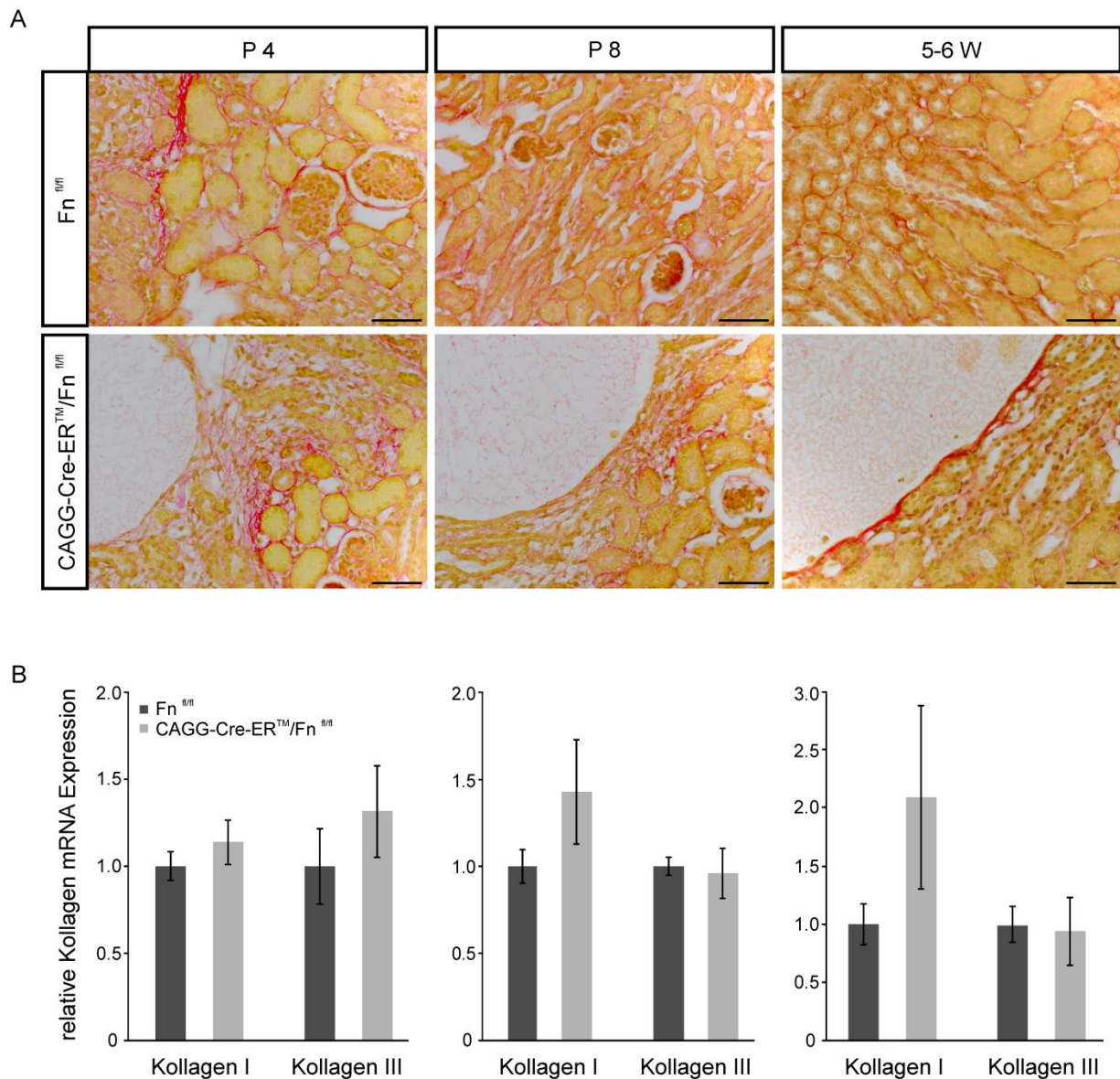


Abbildung 43: Zunehmende Akkumulation von Kollagen ringsum die Zysten

Für die Induktion wurden die Versuchstiere ab P 1 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten im Alter von 4 bzw. 8 Tagen und 5-6 Wochen. (A) Picro-Siriusrot-Färbungen von Sagittalschnitten der Niere wiesen an P 4 und P 8 auf keine erhöhte Menge an Kollagen entlang der Zyste hin. Im Alter von 5-6 Wochen hingegen zeigte sich an der Grenze zur Zyste eine klare Akkumulation von Kollagen I und III. Maßstabsbalken: 50 μ m (B) Quantitative real-time RT-PCR Analysen der gesamten Niere dokumentierten mit zunehmenden Alter und im Vergleich zum Kontrolltier einen tendenziellen Anstieg von Kollagen I in den CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren. Die mRNA-Expression von Kollagen III hingegen schien durch die Deletion von Fn nicht beeinflusst ($n \geq 4$, $n \geq 7$; Mittelwert \pm SEM).

Am postnatalen Tag 4 wies - im Vergleich zur Kontrollgruppe - die Picro-Siriusrot-Färbung auf keine nennenswerte Veränderung des Kollagengehalts in den CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren hin. Am Übergang zur entstehenden Zyste trat ebenfalls kein erhöhter Anteil an kollagenen Fasern auf (Abb. 43 A). Quantitative real-time RT-PCR Analysen bestätigten keinerlei Abweichung der Kollagen I Expression vom Kontrollwert (n = 4, n = 6). Die Kollagen III Expression hingegen schien in den CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} tendenziell leicht erhöht zu sein (Anstieg um 30 %, n = 4, n = 7). (Abb. 43 B, links)

Auch die histologischen Untersuchungen am postnatalen Tag 8 ließen in Tieren mit einer Deletion von Fibronektin keine Modifikation bzgl. der Kollagenfasern erkennen. Ähnlich wie an Tag 4 war das Gewebe ringsum die Zyste nicht spezifisch rot (= Kollagene) angefärbt (Abb. 43 A). Quantitative real-time RT-PCR Analysen dokumentierten in der Gesamtniere einen tendenziellen Anstieg der Kollagen I Expression um 40 % (n = 7, n = 7). Demgegenüber war der Kollagen III mRNA-Level im Vergleich zum Kontrolltier nicht reguliert (n = 7, n = 7) (Abb. 43 B, Mitte).

Im Alter von 5-6 Wochen hingegen war zum Teil eine deutliche Vermehrung kollagener Fasern in der Niere von CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren zu erkennen. Auffällig hierbei war der erhöhte Anteil an Kollagen ringsum die Zyste (Abb. 43 A). Quantitative real-time RT-PCR Untersuchungen ergaben im Vergleich zur Kontrollgruppe bzgl. Kollagen I im Mittel eine Verdopplung des mRNA-Expressionslevels (n = 7, n = 7). Im Gegensatz dazu führte die Deletion von Fibronektin zu keiner Veränderung der Expression von Kollagen III (n = 7, n = 5) (Abb. 43 B, rechts).

Insgesamt betrachtet führen die pathologischen Veränderungen in der Niere langfristig zu einer Akkumulation von Kollagen – insbesondere des Typs I. Hierbei trat in den CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Mäusen jedoch eine große Diskrepanz zwischen den einzelnen Tieren auf, sodass im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden konnten.

3.4.10.2 Die Deletion von Fibronektin führt zu keiner Aktivitätssteigerung von Myofibroblasten entlang des Zystenepithels

Um zu untersuchen, ob die mit der Deletion von Fibronektin einhergehenden renalen Modifikationen zu einer Aktivierung von Myofibroblasten längs der Zyste führen, wurden Sagittalschnitte der Nieren immunhistochemisch gegen α -SMA gefärbt.

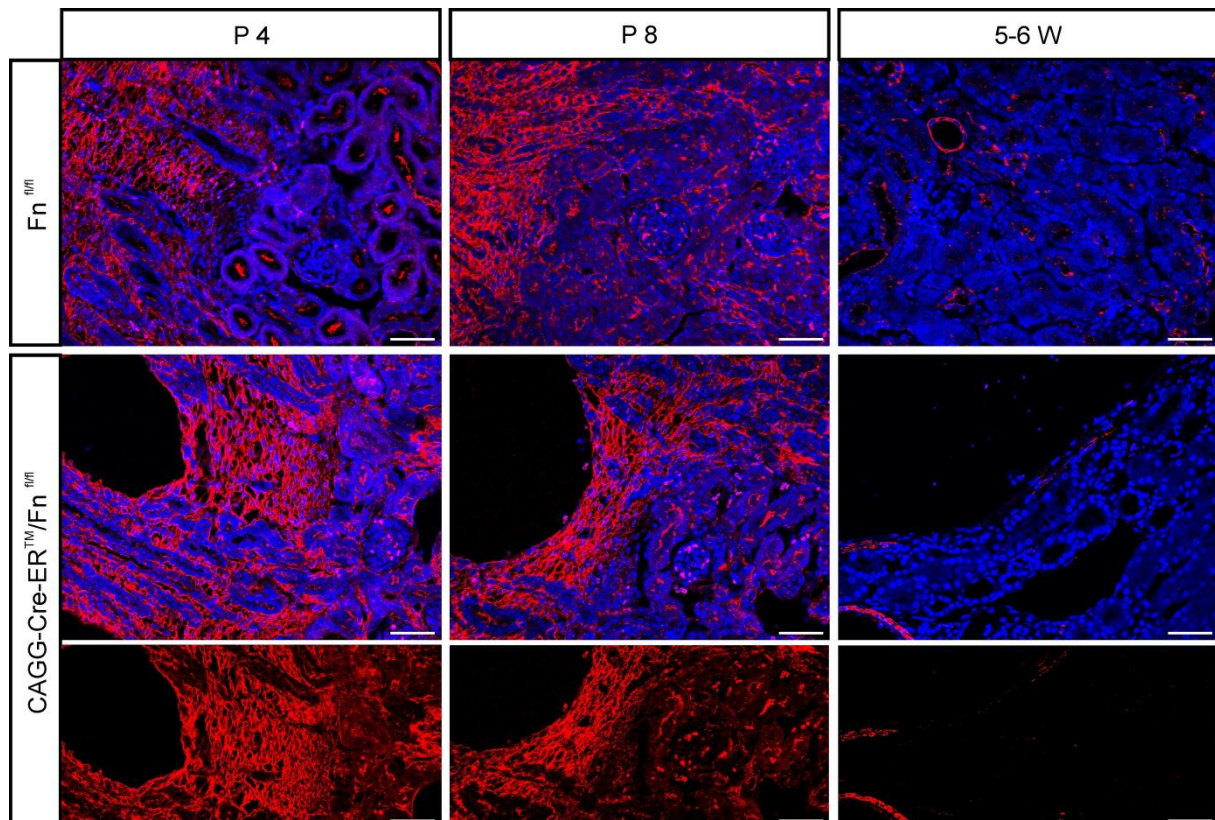


Abbildung 44: Immunhistochemische Färbung gegen α -SMA

Für die Induktion wurden die Versuchstiere ab P 1 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten im Alter von 4 bzw. 8 Tagen und 5-6 Wochen. Immunhistochemische Färbungen von sagittalen Schnitten der Niere gegen α -SMA dokumentierten an P 4 und P 8 ein positives Signal für Zellen entlang der Zyste. 5-6 Wochen nach Induktion konnte längs des geschädigten Gewebes nur noch vereinzelt eine Färbung nachgewiesen werden. Die unterste Reihe zeigt einen Ausschnitt der Zystenbegrenzung. Rot = α -SMA, blau = DAPI; Maßstabsbalken: 50 μ m

Die immunhistochemischen Befunde ließen am postnatalen Tag 4 bzw. 8 sowohl in den $Fn^{fl/fl}$, als auch in den $CAGG-Cre-ER^{TM} / Fn^{fl/fl}$ Tieren eine vermehrte Präsenz von α -SMA im interstitiellen Gewebe des medullären Bereichs erkennen. Zudem war z.T. der Bürstensaum proximaler Tubuli positiv angefärbt. In den $CAGG-Cre-ER^{TM} / Fn^{fl/fl}$ Tieren zeigten darüber hinaus die Zellen längs der entstehenden Zyste ein positives Signal für α -SMA an. Da die Zysten jedoch aufgrund einer Auflockerung

des interstitiellen Gewebes (Abb. 39) entstehen, kann in diesem Fall nicht ausgeschlossen werden, dass das positive Signal aus einer Färbung des Interstitiums resultiert.

Im adulten Tier (5-6 Wochen) konnte eine spezifische Färbung von α -SMA weitestgehend auf die vaskulären Muskelzellen lokalisiert werden, wobei der Bürstensaum proximaler Tubuli ebenfalls ein schwaches Signal offerierte. Entlang der Zystenbegrenzung war kein vermehrtes α -SMA nachweisbar (Abb. 44).

3.4.11 Die Deletion von Fibronektin resultiert langfristig in einer Akkumulation von F-Aktin ringsum die Zysten

Entgegen der immunhistochemischen Analysen bezüglich α -SMA wiesen elektronenmikroskopische Untersuchungen in adulten CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren zum Teil auf eine vermehrte Präsenz von Aktinfilamenten entlang der Zystenbegrenzung hin (Abb. 34 A, Pfeile). Aus diesem Grund wurde anhand von TRITC-konjugiertem Phalloidin filamentöses Aktin (F-Aktin) dargestellt.

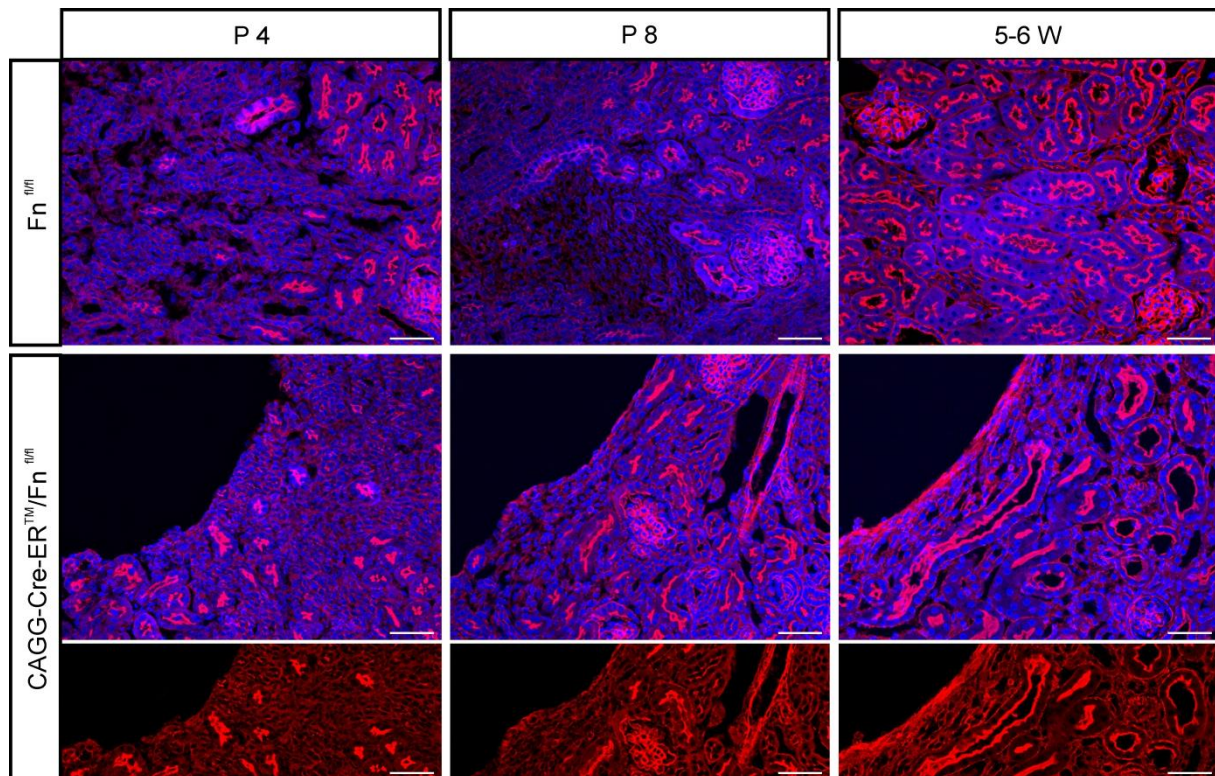


Abbildung 45: Zunehmende Akkumulation von F-Aktin ringsum die Zyste

Für die Induktion wurden die Versuchstiere ab P 1 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten im Alter von 4 bzw. 8 Tagen und 5-6 Wochen. Eine Behandlung des Gewebes mit TRITC-konjugiertem Phalloidin ließ 5-6 Wochen nach Induktionsbeginn eine vermehrte Expression längs der Zyste erkennen. In der untersten Reihe ist ein Ausschnitt der Zystenbegrenzung dargestellt. Rot = F-Aktin, blau = DAPI; Maßstabsbalken: 50 μ m

In Übereinstimmung mit früheren Studien offenbarte sich in Tieren aller betrachteten Altersgruppen ein intensives, positives Signal für Phalloidin im Bürstensaum proximaler Tubuli, sowie dem Nierenkörperchen (Andrews & Bates 1984).

Während in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Mäusen im Alter von 4 bzw. 8 Tagen längs der Zyste keine erhöhte Menge an fibrillärem Aktin nachgewiesen werden konnte, zeigte sich 5-6 Wochen nach Induktion teilweise ein vermehrter Anteil des betrachteten Proteins (Abb. 45).

3.4.12 Transdifferenzierungsprozesse sind nicht in die Entstehung der Zysten involviert

Während der Nierenentwicklung spielt der mesenchymal-epitheliale Differenzierungsprozess von Zellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Tubulussystems. Umgekehrt sind tubuläre Epithelzellen im pathologischen Fall in der

Lage in Myofibroblasten zu transdifferenzieren (Ng et al. 1998). Ferner konnte in klinischen Studien zur ADPKD teilweise eine Verbindung der Zysten zum Tubulussystem dokumentiert werden (Grantham et al. 1987).

Um zu überprüfen, ob die nach einer Deletion von Fibronektin auftretenden Zysten im Zusammenhang mit einem Transdifferenzierungs-Prozess von Zellen stehen, wurden an P 4 und P 14 Serienschnitte renaler Zysten angefertigt und mittels einer Färbung nach Richardson genauestens untersucht. Hierbei wurde vor allem darauf geachtet, ob ein Übergang der die Zyste umgebenden Zellen auf einen Tubulus oder eine andere renale Struktur beobachtet werden kann.

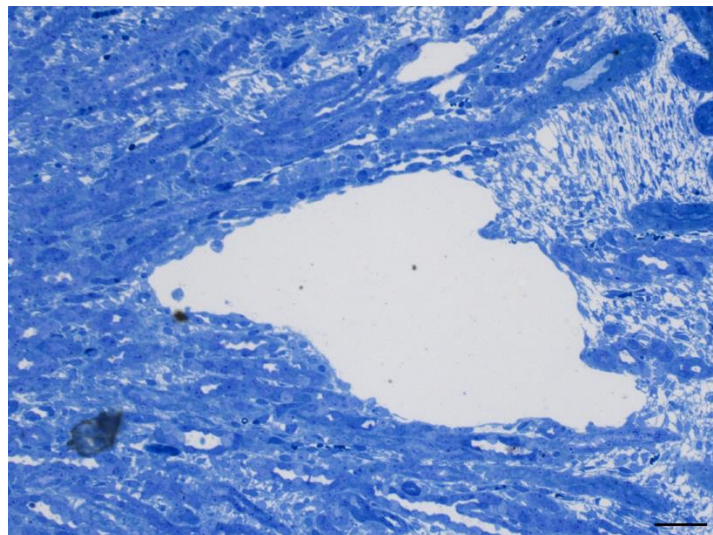


Abbildung 46: Semidünnschnitt einer zystischen Niere nach Tamoxifen-induzierter Deletion von Fn (P 4)

Für die Induktion wurden die Versuchstiere an P 1 und P 2 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die histologische Untersuchung der Niere erfolgte an P 4 mittels einer Färbung nach Richardson. Maßstabsbalken: 50 µm

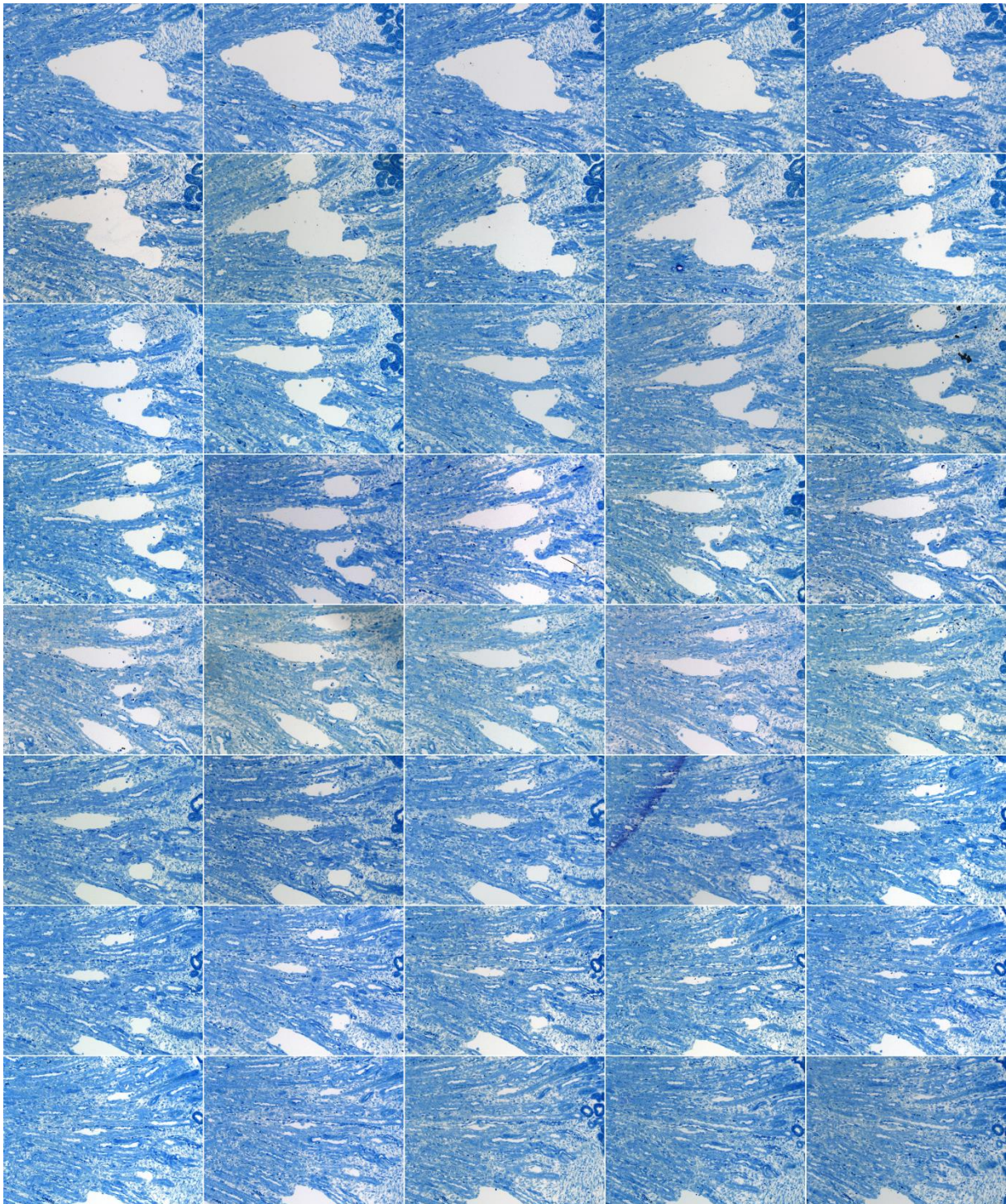


Abbildung 47: Semidünn-Serienschnitte einer renalen Zyste an P 4

Für die Induktion wurden die Versuchstiere an P 1 und P 2 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die histologische Untersuchung der Niere erfolgte an P 4 mittels einer Färbung nach Richardson. Serienschritte ließen keinen Übergang der Zyste zu einer renalen Struktur erkennen.

Semidünn-Serienschnitte renaler Zysten am postnatalen Tag 4 bestätigten lediglich deren Entstehung aufgrund einer Aufweitung des Interstitiums. Es konnte keinerlei Verbindung zu einem angrenzenden Tubulus registriert werden (Abb. 47).

Da in diesem Stadium der Zystenentwicklung jedoch noch keine epithel-ähnliche Abgrenzung des intakten Nierengewebes beobachtet werden konnte (Abb. 33), wurde eine entsprechende Untersuchung nochmals 14 Tage nach Induktionsbeginn durchgeführt.

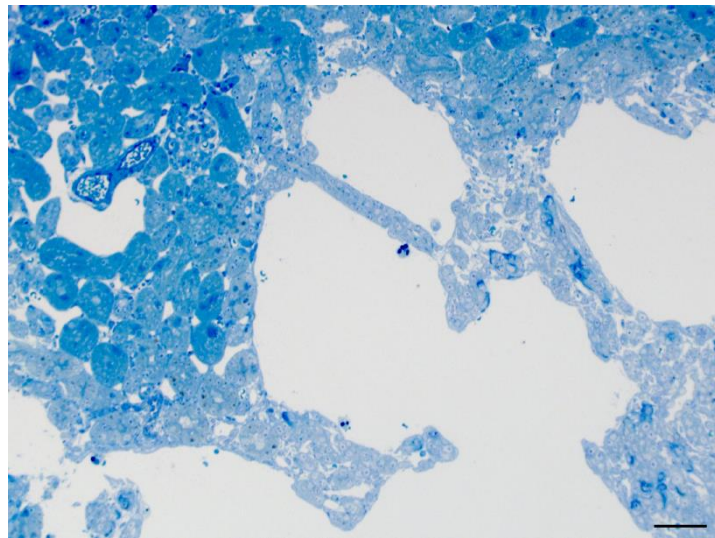


Abbildung 48: Semidünnschnitt einer zystischen Niere nach Tamoxifen-induzierter Deletion von Fn (P 14)

Für die Induktion wurden die Versuchstiere von P 1 bis P 5 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die histologische Untersuchung der Niere erfolgte an P 14 mittels einer Färbung nach Richardson. Maßstabsbalken: 50 µm



Abbildung 49: Semidünn-Serienschnitte einer renalen Zyste an P 14

Für die Induktion wurden die Versuchstiere von P 1 bis P 5 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die histologische Untersuchung der Niere erfolgte an P 14 mittels einer Färbung nach Richardson. Serienschnitte zeigten keinen Übergang der Zyste zu einem Tubulus oder Sammelrohr an.

Mittels Richardson angefärbte Semidünn-Serienschnitte zeigten, dass am postnatalen Tag 14 größtenteils eine klare Begrenzung der Zyste erkennbar war. Obwohl längs der Zyste – neben interstitiellen Zellen - eine Vielzahl von Nierentubuli vermerkt werden konnte, war auch zu diesem Untersuchungszeitpunkt keine eindeutige Fusion mit einem Tubulus bzw. einer anderen renalen Struktur ersichtlich (Abb. 49).

3.4.13 Proteomics-Analysen

Die schwerwiegenden pathologischen Veränderungen in der Niere, sowie die oben beschriebenen immunhistologischen / - chemischen Resultate legen die Vermutung nahe, dass mit einer Deletion von Fibronectin zahlreiche Umstrukturierungen und Expressionsabweichungen einhergehen. Um entsprechende Modulationen aufzudecken, wurde Nierengewebe von sechs Wochen alten Tieren einer Proteomics-Analyse unterzogen. Die Analysen wurden freundlicherweise vom „*Institut für Funktionelle Genomik*“ (Biopark Regensburg, Prof. Dr. Oefner, sowie Prof. Dr. Wolfram Gronwald) durchgeführt. Es wurden insgesamt über 1600 Proteine identifiziert, von denen 1472 ausgewertet werden konnten.

3.4.13.1 Die Deletion von Fibronektin resultiert in einer Zunahme der Proteinexpression ausgewählter Komponenten

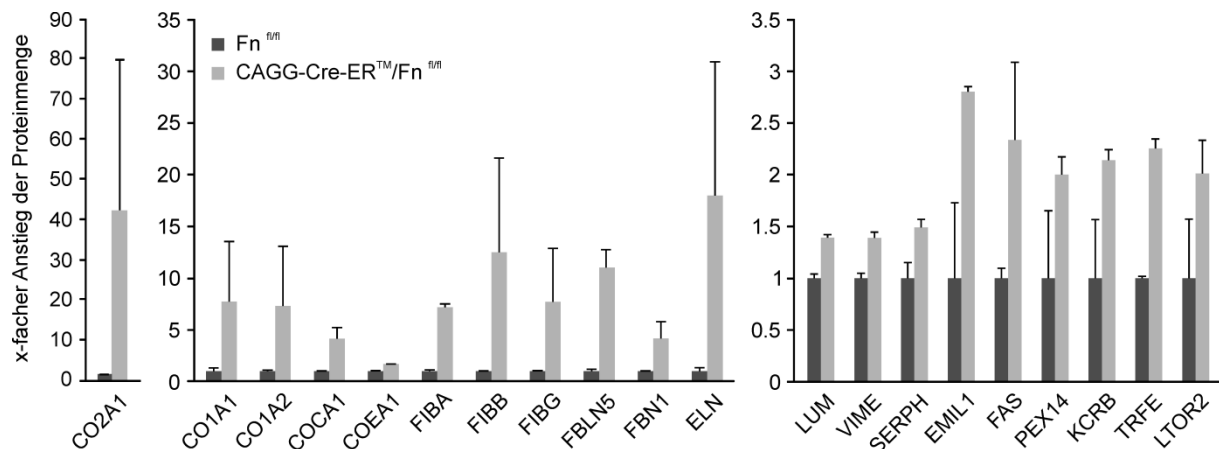


Abbildung 50: Gesteigerte Proteinexpression ausgewählter Komponenten und Faktoren nach einer Deletion von Fibronektin

Für die Induktion wurden die Versuchstiere ab P 1 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Proteomics-Analysen erfolgten im Alter von 5-6 Wochen. Die Untersuchungen offenbarten einen Anstieg ausgewählter ECM-Komponenten (Kollagene, Fibulin-5, Fibrillin-1, Lumican, Elastin, Serpin H1, Emilin-1), des Gerinnungsfaktors Fibrinogen, Elementen des Zytoskeletts (Vimentin, Serotransferrin), sowie von Faktoren des Zellstoffwechsels (Fettsäuresynthese, Kreatinkinase, Peroxisom-gebundenes Membranprotein) und Zellwachstums (Regulator Komplexprotein Lamtor2) (n=2, n=2; Mittelwert ± SD)

CO2A1 = Collagen alpha-1(II) chain; CO1A1 = Collagen alpha-1(I) chain; CO1A2 = Collagen alpha-2(I) chain; COCA1 = Collagen alpha-1 (XII) chain; COEA1 = Collagen alpha-1 (XIV) chain; FIBA = Fibrinogen alpha chain; FIBB = Fibrinogen beta chain; FIBG = Fibrinogen gamma chain; FBLN5 = Fibulin-5; FBN1 = Fibrillin-1; ELN = Elastin; LUM = Lumican; VIME = Vimentin; SERPH = Serpin H1; EMIL1 = EMILIN-1; FAS = fatty acid synthase; PEX14 = peroxisomal membrane protein PEX14; KCRB = Creatine kinase B-type; TRFE = Serotransferrin; LTOR2 = Regulator complex protein LAMTOR2

Die Proteomics-Analysen dokumentierten einen Anstieg verschiedenster Komponenten der extrazellulären Matrix. So nahm beispielsweise die Expression von Kollagen Typ II (CO2A1) nach einer Deletion von Fibronektin um das 41,9-fache zu; Typ I Kollagene (CO1A1 und CO1A2) zeigten im Vergleich zum Kontrolltier einen durchschnittlich 7,5-fachen Anstieg. Die Menge an Fibulin-5 (FBLN5, 11-fach), Fibrillin-1 (FBN1, 4,2-fach), Elastin (ELN, 18-fach) und Lumican (LUM, 1,4-fach) war ebenfalls erhöht.

Zudem wuchs die Proteinexpression ausgewählter Faktoren des Zellstoffwechsels - wie die Fettsäuresynthese (FAS), Kreatinkinase (KCRB) und das Peroxisom-spezifische Membranprotein PEX14 - in etwa um das Doppelte an. In gleichem Maße nahm die Proteinmenge an Serotransferrin (TRFE) – einem Protein, das im

Organismus essentiell für den Eisentransport ist - und LAMTOR2 (LTOR2) – eine Komponente, die das Zellwachstum positiv beeinflussen kann - zu (Abb. 50).

3.4.13.2 Die Deletion von Fibronektin führt zu einer Abnahme ausgewählter Komponenten

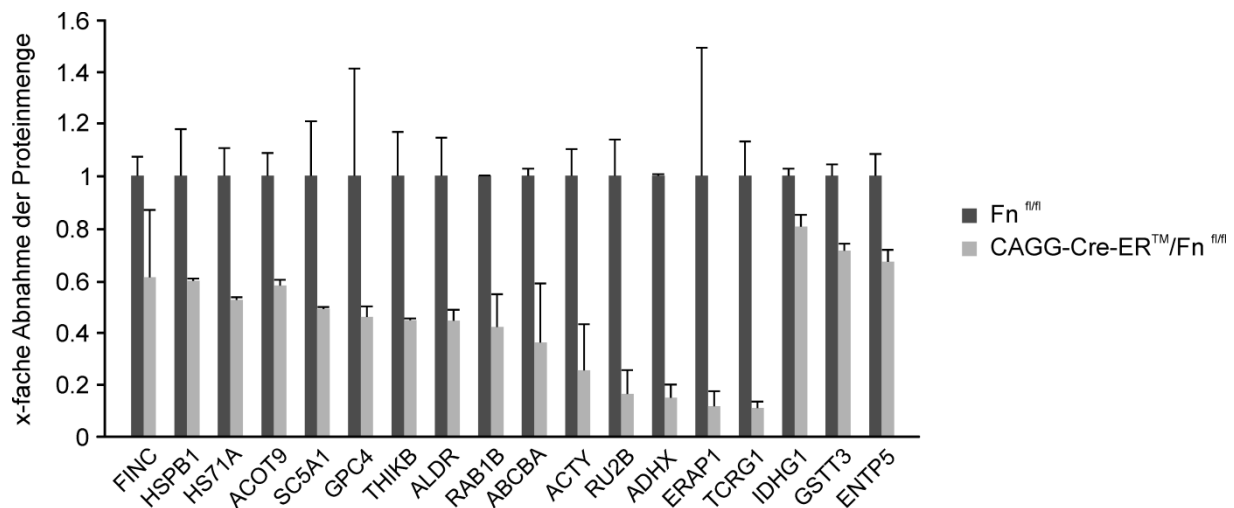


Abbildung 51: Verringerte Proteinexpression ausgewählter Komponenten und Faktoren nach einer Deletion von Fibronektin

Für die Induktion wurden die Versuchstiere ab dem postnatalen Tag 1 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Proteomics-Analysen erfolgten im Alter von 5-6 Wochen. Die Untersuchungen ergaben eine Reduktion von Faktoren, die in die renale Entwicklung involviert sind (GPC4, ALDR), Komponenten des Zellstoffwechsels (ACOT9, THIKB, RAB1B, IDHG1, GSTT3, ENTP5), Transporterproteinen (SC5A1, ABCBA) und Elementen der RNA- bzw. Proteinprozessierung (TCRG1, RU2B, HSPB1, HS71A). Zudem war die Proteinmenge von Faktoren verringert, die u.a. den Blutdruck beeinflussen (ADHX, ERAP1) (n=2, n=2; Mittelwert ± SD)

FINC = Fibronektin; HSPB1 = heat shock protein beta-1; HS71A = Heat shock 70 kDa protein 1a; ACOT9 = Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial; SC5A1 = sodium / glucose cotransporter 1; GPC4 = Glypican; THIKB = 3-ketoacyl-CoA thiolase B, peroximal; ALDR = Aldose reductase; RAB1B = Ras-related protein Rab-1B; ABCBA = ATP-binding cassette sub-family B member 10, mitochondrial; ACTY = Beta-actin; RU2B = U2 small nuclear ribonucleoprotein B"; ADHX = Alcohol dehydrogenase class-3; ERAP1 = Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1; TCRG1 = Transcription elongation regulator 1; IDHG1 = Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma 1, mitochondrial; GSTT3 = Glutathione S-transferase theta-3; ENTP5 = Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5

Interessanterweise ergaben die Proteomics-Untersuchungen eine Reduktion derjenigen Proteine, die in die renale Entwicklung involviert sind. So ist zum Beispiel Glypican (GPC4), das vermutlich bei der Entstehung der renalen Tubuli mitwirkt, nach einer Deletion von Fibronektin um das 0,5-fache verringert. Die Aldosereduktase beeinflusst die Entwicklung der Sammelrohre und war in diesem Fall ebenfalls herabgesetzt (0,4-fach).

Zudem waren ausgewählte Komponenten des Zellstoffwechsels verringert, die u.a. beim Fettsäurehaushalt eine Rolle spielen (ACOT9 0,6-fach; THIKB 0,4-fach).

Hinsichtlich spezifischer Transporterproteine war insbesondere ein Rückgang des Natrium-Glucose-Kotransporters (SC5A1), der im Normalfall in den proximalen Tubuli exprimiert wird, um das 0,5-fache zu beobachten.

Ferner war eine deutliche Reduktion des Proteingehalts einer Alkoholdehydrogenase (ADHX; 0,2-fach) und Amino-peptidase (ERAP1; 0,1-fach), die u.a. Einfluss auf den Blutdruck ausüben können, erkennbar (Abb. 51).

3.4.14 Die Deletion von Fibronektin geht mit einem erhöhten Albuminspiegel im Urin einher

Um zu überprüfen, inwieweit die pathologischen Veränderungen in der Niere deren Funktion einschränken, wurde der Urin von $Fn^{fl/fl}$ und $CAGG-Cre-ER^{TM} / Fn^{fl/fl}$ Tieren bezüglich des Albumin-, Natrium- und Kaliumspiegels untersucht. Die gemessenen Werte wurden relativ zum Kreatiningehalt betrachtet. Ferner wurde die Osmolalität des Urins ermittelt. Die Untersuchungen wurden freundlicherweise vom „*Institut für Physiologie*“ (Universität Regensburg, Prof. Dr. Frank Schweda) durchgeführt.

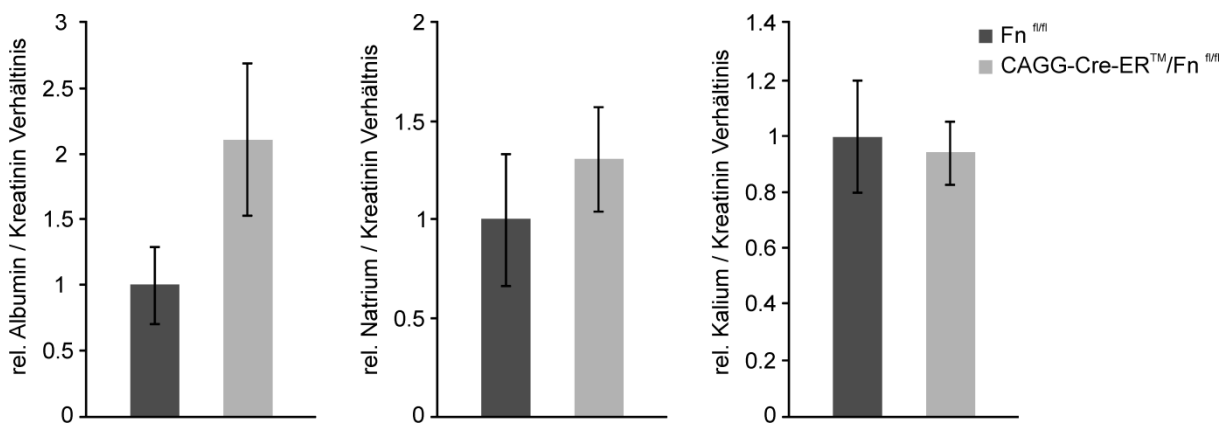


Abbildung 52: Relativer Albumin-, Natrium- und Kalium-Spiegel im Urin von $Fn^{fl/fl}$ und $CAGG-Cre-ER^{TM} / Fn^{fl/fl}$ Mäusen

Für die Induktion wurden die Versuchstiere von P 1 bis P 5 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen des Urins erfolgten im Alter von 5-6 Wochen. Die Analysen zeigten einen tendenziellen Anstieg des Albuminspiegels nach einer Deletion von Fibronektin. Der Natrium- und Kaliumspiegel war im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert. Die gemessenen Werte wurden jeweils relativ zum Kreatiningehalt betrachtet ($n \geq 4$, $n=7$; Mittelwert \pm SEM).

Die Analysen ließen im Urin von CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Mäusen einen tendenziell, jedoch nicht signifikant erhöhten Albuminspiegel erkennen (n=5, n=7). Der Natrium- (n=4, n=7) und Kaliumspiegel (n=5, n=7) war im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht verändert (Abb. 52).

Ebenso konnte bezüglich der Osmolalität zwischen den beiden Versuchsgruppen kein Unterschied dokumentiert werden (Fn^{fl/fl} $1,1 \pm 0,1$ Osmol/kg vs. CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} $0,9 \pm 0,1$ Osmol/kg; nicht gezeigt).

3.4.15 Die Zystenbildung nach einer Deletion von Fibronektin ist abhängig vom Induktionszeitpunkt

Um zu untersuchen, ob eine Deletion von Fibronektin zu einem späteren Zeitpunkt in der Nierenentwicklung ebenfalls zu einer Bildung von renalen Zysten führt, wurden Versuchstiere ab dem postnatalen Tag 5, 10 und 21 mit Tamoxifen-Augentropfen behandelt.

3.4.15.1 Eine Deletion von Fibronektin ab dem postnatalen Tag 5 führt ebenfalls zu einer Zystenbildung

Wu und Kollegen (2013) konnten anhand von Genexpressionsanalysen eine Veränderung im Transkriptionsmuster verschiedenster Gene während der postnatalen Entwicklung nachweisen. So verzeichneten sie z.B. zwischen dem postnatalen Tag 5 und 7 eine progressive Abnahme von Genen, die mit Zellwachstum und der embryonalen Entwicklung in Verbindung stehen.

Um nachzuprüfen, inwieweit Fibronektin in dieses Stadium der Nierenentwicklung involviert ist, wurden in nachfolgenden Experimenten Tiere ab dem postnatalen Tag 5 mit Tamoxifen-Augentropfen behandelt.

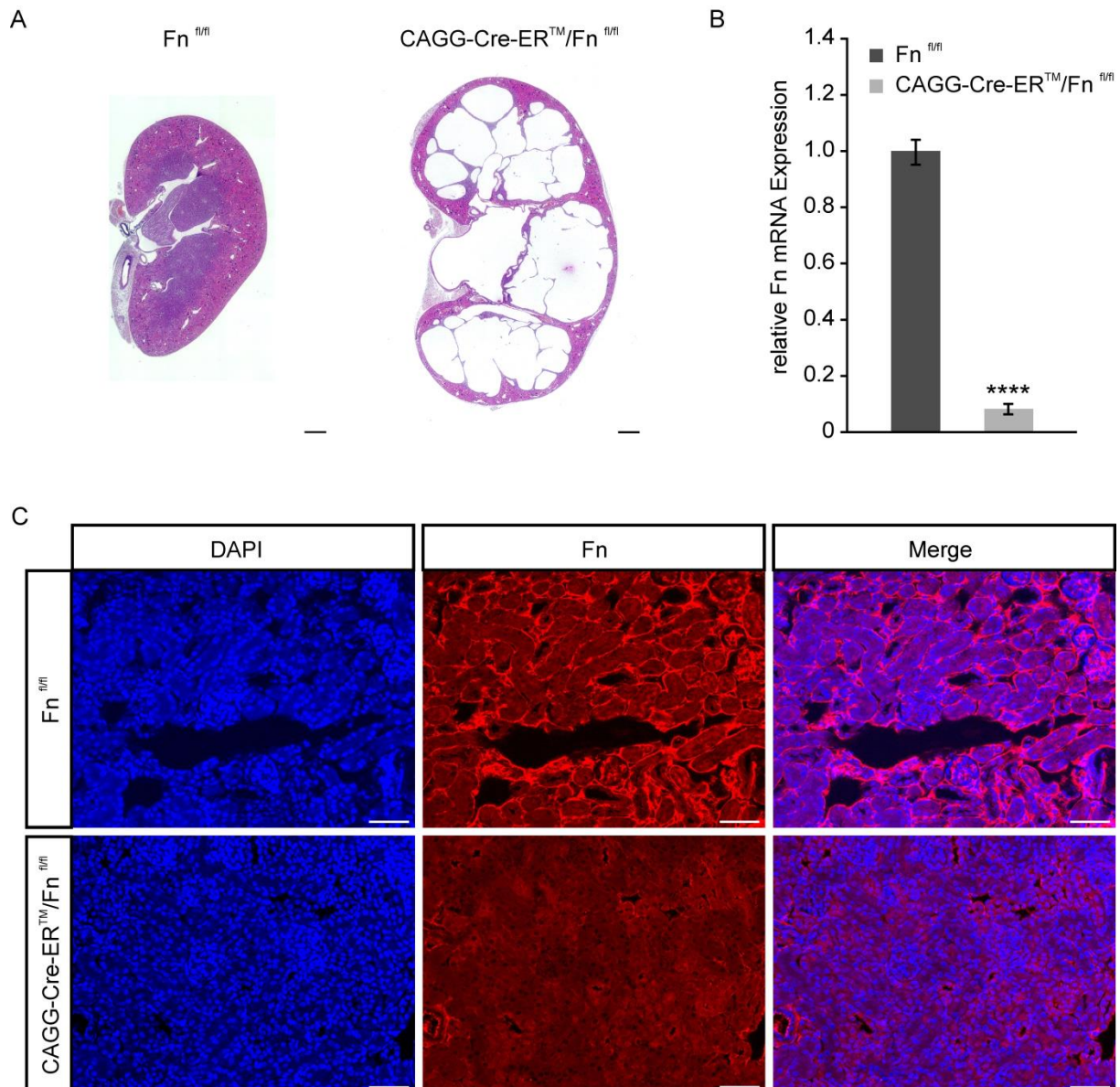


Abbildung 53: Eine Deletion von Fn ab P 5 resultiert ebenfalls in der Bildung von renalen Zysten

Für die Induktion wurden die Versuchstiere von P 5 bis P 9 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Isolation des Gewebes erfolgte zwei Wochen nach Induktionsbeginn. (A) HE-Färbungen der Nieren dokumentieren die Bildung von renalen Zysten in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren. Maßstabsbalken: 500 µm (B) Quantitative real-time RT-PCR Analysen zeigten im Vergleich zum Kontrolltier eine höchst signifikante Abnahme der Fn mRNA-Expression in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren (n = 4, n = 4; Mittelwert ± SEM; ****p<0,001). (C) Immunhistochemische Färbungen gegen Fn an sagittalen Schnitten der Niere bestätigten eine klare Reduktion der Fibronectinmenge in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren. Maßstabsbalken: 50 µm

Eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Nieren zeigte, dass die ubiquitäre Deletion von Fibronectin ab dem postnatalen Tag 5 ebenfalls zu einer Bildung von renalen Zysten führt (Abb. 53 A). Hierbei war die phänotypische Ausprägung der renalen Zysten ähnlich drastisch wie in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren, die bereits ab dem postnatalen Tag 1 mit Tamoxifen behandelt wurden (siehe Abb. 30, P 14).

Quantitative real-time RT-PCR Untersuchungen bestätigten in den CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren eine Verringerung des Fn mRNA Levels um 90 % ($p < 0,001$) (Abb. 53 B). Darüber hinaus wiesen die immunhistochemischen Färbungen auf eine deutliche Reduktion des Fibronektin Gehalts in den CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren hin (Abb. 53 C).

3.4.15.2 Eine Deletion von Fibronektin ab dem postnatalen Tag 10 führt zu keiner Entwicklung von Zysten

Zwischen dem postnatalen Tag 10 und 14 wurde in der gesunden Mauslinie ein Expressionsanstieg derjenigen Gene beobachtet, die mit dem Lipid- und Energiestoffwechsel bzw. dem molekularen Transport von Stoffen in Zusammenhang stehen (Wu et al. 2013). Um zu untersuchen, ob hierbei ein Mangel an Fibronektin zu pathologischen Veränderungen führt, wurden Versuchstiere in eben diesem Zeitraum 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen behandelt.

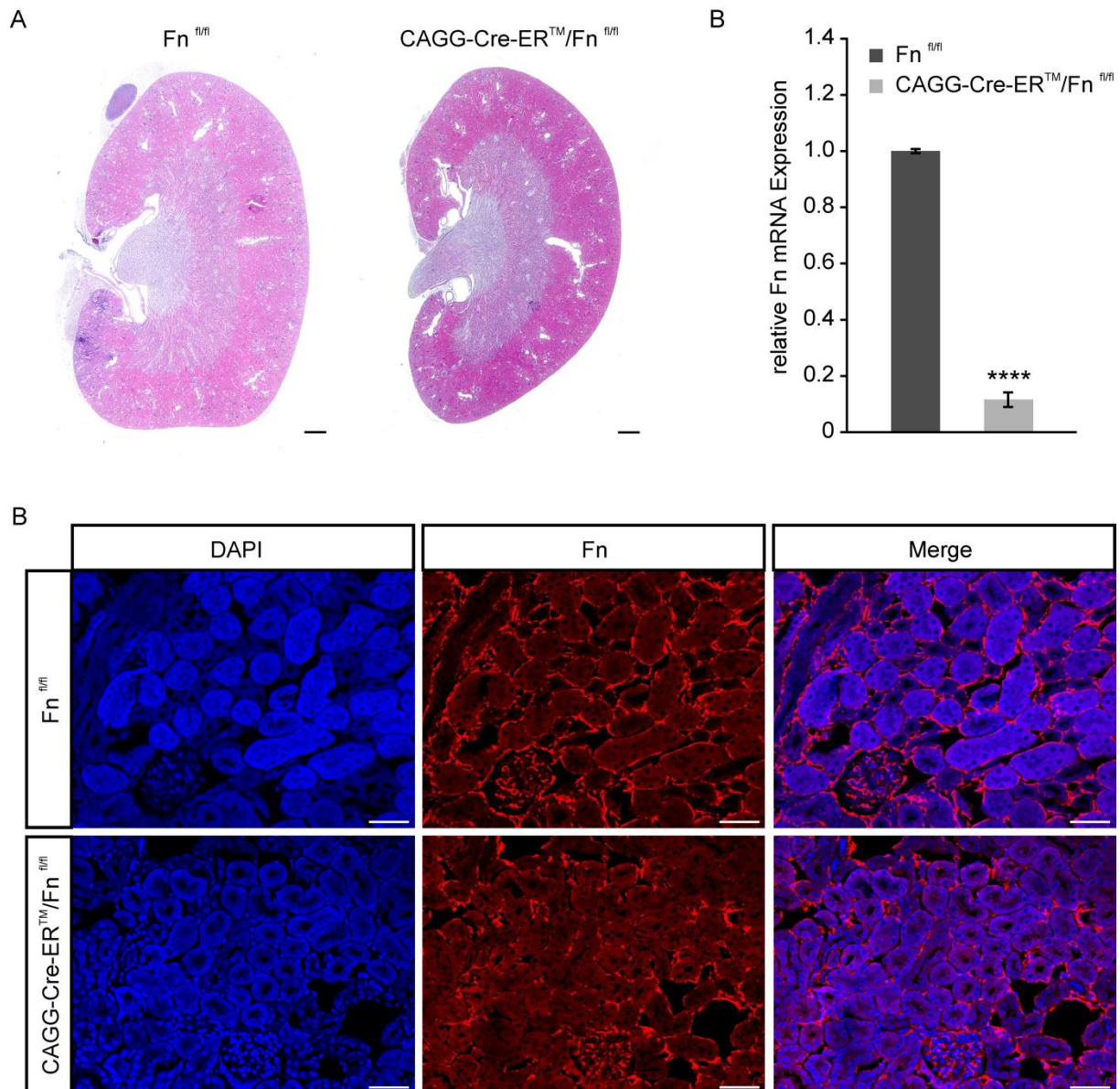


Abbildung 54: Eine ubiquitäre Deletion von Fn ab P 10 führt zu keiner Bildung von renalen Zysten

Für die Induktion wurden die Versuchstiere von P 10 bis P 14 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten sechs Wochen nach Induktionsbeginn. (A) HE-Färbung der Nieren ließen keine Bildung von renalen Zysten in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren erkennen. Maßstabsbalken: 500 µm (B) Quantitative real-time RT-PCR Analysen belegten eine höchst signifikante Abnahme der Fn mRNA-Expression in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren (n = 3, n = 7; Mittelwert ± SEM; ****p<0,001). (C) Immunhistochemische Färbungen gegen Fn an Sagittalschnitten der Niere wiesen im Vergleich zum Kontrolltier auf eine moderate Reduktion des Fibronektin Gehalts in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren hin. Maßstabsbalken: 50 µm

Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von renalen Sagittalschnitten zeigten auf, dass eine Deletion von Fibronektin nach dem postnatalen Tag 10 keine Bildung von Zysten nach sich zieht (Abb. 54 A). Quantitative real-time RT-PCR Analysen ließen gegenüber der Kontrollgruppe in den CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren eine höchst signifikante Abnahme der Fibronektin mRNA Expression um ca. 90 % erkennen

($p < 0,001$) (Abb. 54 B). Immunhistochemische Färbungen wiesen im Vergleich zu den Kontrolltieren auf eine moderate Reduktion von Fibronectin hin (Abb. 54 C).

3.4.15.3 Eine Deletion ab dem postnatalen Tag 21 resultiert in keine Zystenbildung

Etwa 3 - 4 Wochen nach der Geburt ist die Entwicklung der Mausniere vollständig abgeschlossen (Wu et al. 2013). Inwieweit ein Defizit an Fibronectin am Ende der Nierenentwicklung deren Morphologie beeinflusst, wurde anhand einer Deletion ab dem postnatalen Tag 21 aufgeklärt. Die Versuchstiere wurden hierzu von postnatalem Tag 21 bis 25 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen behandelt und die Nieren im Alter von 8 - 9 Wochen entnommen.

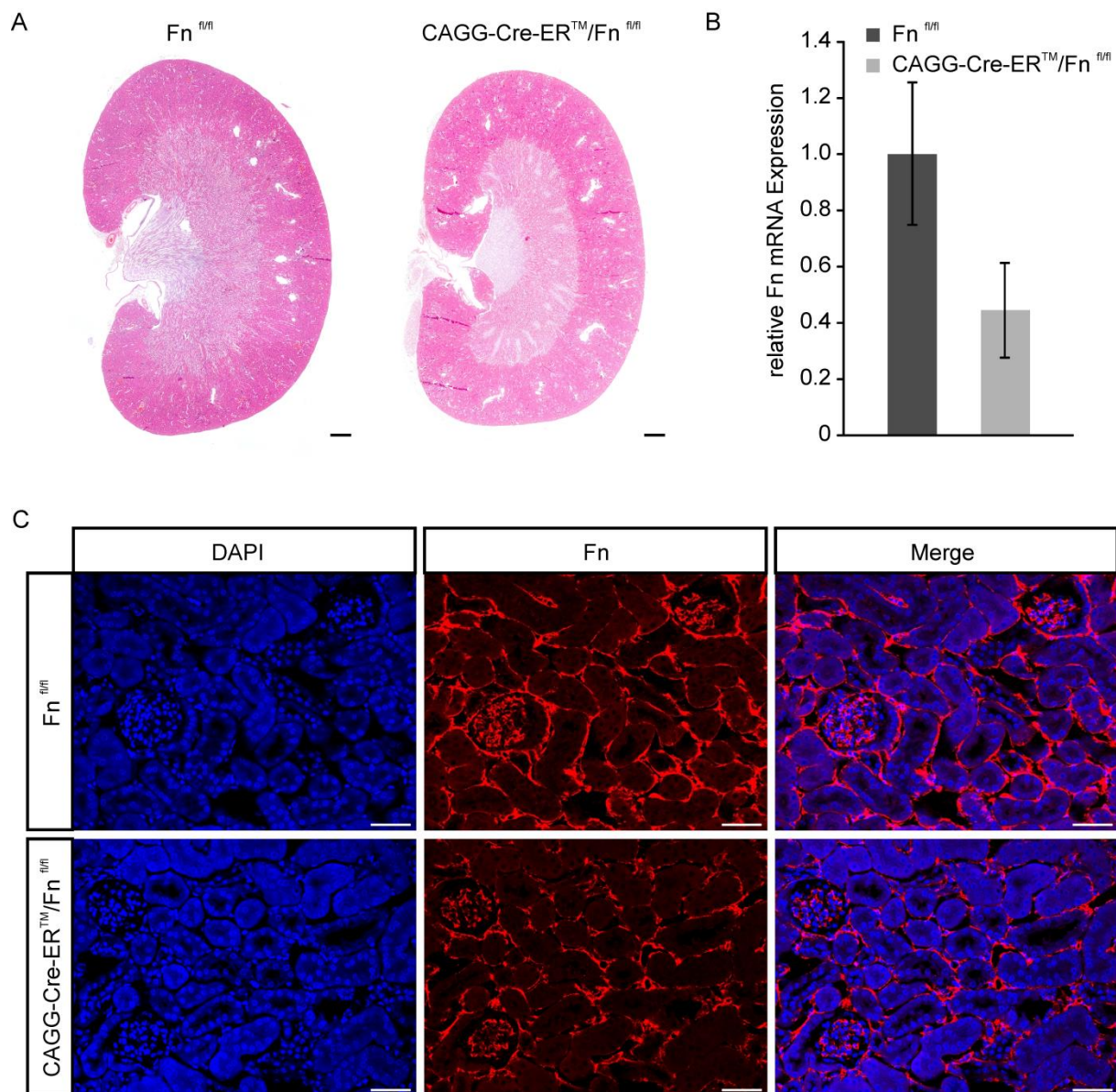


Abbildung 55: Die Deletion von Fn nach Abschluss der renalen Entwicklung führt zu keiner Zystenbildung in der Niere

Für die Induktion wurden die Versuchstiere von P 21 bis P 25 3x täglich mit Tamoxifen-Augentropfen (2,5 mg /ml) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten nach 5-6 Wochen. (A) HE-Färbungen der Nieren ließen keine Zystenbildung in $CAGG-Cre-ER^{TM}/Fn^{fl/fl}$ Tieren erkennen. Maßstabsbalken: 500 μm (B) Quantitative real-time RT-PCR Analysen zeigten in Relation zur Kontrollgruppe eine tendenziell verringerte Fn mRNA-Expression in $CAGG-Cre-ER^{TM}/Fn^{fl/fl}$ Tieren an. ($n = 4$, $n = 5$; Mittelwert \pm SEM). (C) Immunhistochemische Färbungen gegen Fn an Sagittalschnitten der Niere bekundeten im Vergleich zum Kontrolltier keine Reduktion von Fibronectin in $CAGG-Cre-ER^{TM}/Fn^{fl/fl}$ Mäusen. Maßstabsbalken: 50 μm

Histologische Untersuchungen anhand einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung von sagittalen Nierenschnitten ließen bei einer Deletion von Fibronectin ab dem postnatalen Tag 21 keine Zystenbildung erkennen (Abb. 55 A).

Quantitative real-time RT-PCR Analysen zeigten relativ zur Kontrolle in den CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren im Mittel eine Reduktion der Fibronektin mRNA Expression um 56 % auf (Abb. 55 B).

Die immunhistochemischen Färbungen gegen Fibronektin ergaben bezüglich der Proteinmenge keinen Unterschied zwischen den Kontroll- und CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren (Abb. 55 C).

4. Diskussion

4.1 Die postnatale ubiquitäre Deletion von Fibronektin mittels Tamoxifen-Augentropfen

Das Cre / loxP-Rekombinationssystem ermöglicht eine zeit- und gewebespezifische Deletion spezifischer DNA-Sequenzen. Daher ist dieses Tool vor allem bei der Untersuchung von Genen hilfreich, deren generelle Defizienz schon während der Embryonalphase zum Tode führen würde. Die Spezifität kann hierbei durch verschiedene Arten gewährleistet werden. So erlaubt z.B. die Expression der Cre-Rekombinase unter Kontrolle eines Promotors, welcher explizit im Zielgewebe aktiv ist, eine gewebsspezifische Deletion. Der Einsatz eines induzierbaren Cre / loxP-Systems gestattet ein zeitspezifisches Rekombinationsereignis (Kos 2004).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde das Tamoxifen-induzierbare Cre / loxP- System genutzt, um Fibronektin, dessen generelle Defizienz bereits ab Embryonaltag 8 zu einer abnormalen Entwicklung und schlussendlich zu einer Letalität führt, gezielt nach der Geburt zu deletieren (George et al. 1993). Primäres Ziel war es hierbei, zunächst die Bedeutung von Fibronektin für Struktur und Funktion des trabekulären Abflusswegs bzw. bei der Aufrechterhaltung des intraokulären Drucks zu erforschen. Bisher konnten noch keine transgenen Mauslinien generiert werden, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle eines Trabekelwerk-spezifischen Promotors exprimieren. Grund hierfür ist wohl die Tatsache, dass die mesenchymalen Zellen des Trabekelwerks keine für sie spezifischen Proteine bilden. Daher kam in dieser Studie eine transgene Maus zum Einsatz, deren Rekombinase zum einen an eine ubiquitär exprimierte Promotorsequenz gekoppelt, zum anderen mit einer mutierten Form des Östrogen-Rezeptors fusioniert war (CAGG-CreERTM). Letzteres ermöglicht die zeitlich kontrollierbare Induktion mittels einer Applikation von Tamoxifen, wobei die Aktivität der Cre-Rekombinase positiv mit der Tamoxifen-Dosis korreliert (Hayashi & McMahon 2002). Im Mausmodell kann Tamoxifen über Injektion, z.B. peritoneal, oder durch Beigabe ins Futter verabreicht werden. Hierbei wird Tamoxifen, welches als Prodrug in einen aktiven Metaboliten umgewandelt werden muss, von CYP2D6 (einer Cytochrom P450 Isoform) in das aktive Endoxifen umgewandelt. In unserer Arbeitsgruppe wurde ein Protokoll entwickelt, das zur erfolgreichen und effektiven Induktion der Cre-Rekombinase im gesamten Auge mittels einer Applikation von

Tamoxifen-Augentropfen führt (Schlecht et al. 2015). Dabei wird das Anti-Östrogen mit einer Dosis von 5 mg/ml verabreicht. Vermutlich wird bei diesem Protokoll Tamoxifen durch das in der Hornhaut des Auges vorhandene CYP2D6 metabolisiert und die aktiven Metaboliten dann von der Augenoberfläche in die generelle Zirkulation resorbiert (Farkouh et al. 2016; Kölln & Reichl 2016).

Die durch die Tamoxifen-Behandlung induzierte Deletion von Fibronectin ging jedoch mit einer renalen Zystenbildung und schlussendlich dem frühen Versterben der Tiere einher. Um die Lebensdauer der Tiere zu verlängern und somit eine genauere Analyse der trabekulären Veränderungen zu ermöglichen, wurde Tamoxifen in der hier vorliegenden Studie mit einer Dosis von 2,5 mg/ml appliziert.

Experimente in mT/mG Cre-Reportermäusen (CAGG-CreERTM / mT/mG) bestätigten auch bei einer Tamoxifen-Dosis von 2,5 mg/ml die erfolgreiche Aktivierung der Rekombinase im vorderen Augenabschnitt anhand von Tamoxifen-Augentropfen. Zudem war auch außerhalb des Auges - wie der Niere und der Leber - ein Rekombinationsereignis nachweisbar, was die Annahme einer Aufnahme aktiver Metaboliten in den Blutkreislauf bestätigt. Da in der hier vorliegenden Studie die Cre-Rekombinase unter Kontrolle eines ubiquitären Promotors exprimiert wird, findet ein entsprechendes Rekombinationsereignis in nahezu jeder Zelle statt. Alles in allem zeigten die Versuche der mT/mG-Reportermauslinie, dass mittels einer Applikation von Tamoxifen-Augentropfen die Cre-Rekombinase nicht nur im, sondern auch außerhalb des Auges erfolgreich induziert werden kann.

4.2 Die Rolle von Fibronectin im gesunden Mausauge

Die Befunde dieser Studie deuten darauf hin, dass Fibronectin im gesunden Mausauge nur eine untergeordnete Rolle bei der postnatalen Morphogenese, sowie der Aufrechterhaltung der Struktur der trabekulären Abflusswege und des intraokulären Drucks spielt. Diese Schlussfolgerung basiert auf folgenden Beobachtungen: 1. Eine postnatale Deletion von Fibronectin geht – trotz der verminderten Bildung einer Reihe von Komponenten der fibrillären, extrazellulären Matrix - mit keinen ausgeprägten morphologischen Veränderungen des Trabekelwerks einher. 2. Ein Mangel an Fibronectin hat keinen Einfluss auf die Expression von alpha-smooth muscle-Aktin und somit sehr wahrscheinlich auf die

Kontraktilität des Trabekelwerks. 3. Eine Deletion von Fibronektin hat keine Auswirkungen auf den intraokulären Druck.

Quantitative real-time RT-PCR Analysen bestätigten 5-6 Wochen nach der postnatalen Tamoxifen-Behandlung eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression im Korneoskleralring um 68 %. Immunhistochemische Analysen zeigten allerdings, dass dies zu einer unterschiedlichen Abnahme von Fibronektin in den im Ring enthaltenen Geweben führt. So war Fibronektin im juxtakanalikulären Trabekelwerk deutlich vermindert, während es nur zu geringfügigen Veränderungen der Immunreaktivität von Fibronektin in Sklera und Kornea kam. Dieser Befund ist vermutlich auch der Grund, dass wir in Western Blot Untersuchungen des Korneoskleralrings keine signifikante Abnahme der Fibronektinmenge nachweisen konnten. Insgesamt war das unterschiedliche Verhalten von Fibronektin mRNA und Protein zunächst überraschend, da aus *in vivo* Untersuchungen bekannt war, dass Fibronektin einen schnellen Umsatz zeigt. Sottile & Hocking (2002) wiesen mit Hilfe von Fibronektin-defizienten Zellen nach, dass die Stabilität extrazellulärer Fibronektin-Fibrillen von der Präsenz des Glykoproteins im umgebenden Medium abhängt. So konnten die Wissenschaftler bei einem Mangel bereits nach 12 Stunden einen Rückgang des Proteins in der extrazellulären Matrix um 40 % nachweisen; nach 23 Stunden waren bereits 65 % der Fibrillen abgebaut. In unserem *in vivo* System reicht dagegen offenbar eine mRNA-Expression von 32 % aus, um Fibronektin zumindest teilweise in Sklera und Kornea zu erhalten.

Fibronektinfibrillen werden extrazellulär durch Transglutaminasen vernetzt, wodurch der Abbau des Glykoproteins weiterhin verzögert bzw. verhindert werden soll (Akimov et al. 2000; Wang et al. 2010). Dieser Prozess lässt sich auch in Zellen des Trabekelwerks nachweisen (Welge-Lüssen et al. 2000). Im Mausauge spielen die posttranslationalen Vernetzungen offenbar allerdings eine wichtigere Rolle in Sklera und Kornea als im juxtakanalikulären Teil des Trabekelwerks, wo es zu einer deutlichen Abnahme von Fibronektin kam. Dies liegt vermutlich daran, dass in der ersten Woche nach der Geburt die Morphogenese des Trabekelwerks im Mausauge noch nicht abgeschlossen ist, und die morphogenetischen Prozesse durch eine frühzeitige posttranslationale Vernetzung von Fibronektin eher gestört oder verhindert würden. Insgesamt gelang es uns allerdings dadurch unser Ziel zu

erreichen, die Menge an Fibronectin in den für den trabekulären Abflusswiderstand verantwortlichen Geweben deutlich zu senken.

Zahlreiche unabhängige Studien legten bislang die Vermutung nahe, dass Fibronectin den Kammerwasserabfluss beeinflusst. So ist Fibronectin – in Interaktion mit seinen Bindungspartnern – generell in eine Vielzahl biologischer Prozesse involviert, die sich auf den Kammerwasserabfluss auswirken sollten, wie z.B. dem Umsatz von ECM, der Signalübertragung von Wachstumsfaktoren oder einer Aufrechterhaltung des Zytoskeletts (Faralli et al. 2009). Zudem zeigten Studien auf, dass das Glykoprotein u.a. in der juxtakanalikulären Region - also dem Bereich des Trabekelwerks, in dem der Abflusswiderstand des Kammerwassers lokalisiert ist – exprimiert wird; in diesem Zusammenhang konnte die größte Menge in der peripheren Region des Hüllmaterials der elastischen Fasern im cribriformen Plexus identifiziert werden (Hann et al. 2001). Fibronectin ist außerdem auch Komponente des Kammerwassers (Reid et al. 1982). Den wohl deutlichsten Hinweis auf eine Beteiligung des Glykoproteins beim Kammerwasserabfluss lieferten Santas et al. (2003) mit *ex vivo* Studien menschlicher Augen. Perfusionsexperimente offenbarten, dass die Blockierung der Heparin II Bindungsdomäne von Fibronectin durch die Perfusion von spezifischen, mit der Bindung konkurrierenden Peptide die Abflussfaszilität im vorderen Augensegment um 93 % erhöhen kann. Interessanterweise war in diesem Zusammenhang eine Ablösung des Schlemm-Kanal Endothels vom darunterliegenden juxtakanalikulären Gewebe zu beobachten. Dies weist darauf hin, dass Fibronectin in dieser Region essentiell an der Verankerung der Schlemm -Kanal Zellen in der extrazellulären Matrix des Trabekelwerks beteiligt ist.

Aufgrund dieser Befunde wurde hinsichtlich der morphologischen Untersuchungen in der hier vorliegenden Studie insbesondere der Bereich zwischen dem Schlemm-Kanal Endothel und der ersten Zellschicht des juxtakanalikulären Gewebes betrachtet. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen ließen nach einer Deletion von Fibronectin generell eine verminderte Menge an fibrillärer extrazellulärer Matrix erkennen. Diese Befunde konnten sowohl an sagittalen, als auch an tangentialen Augenschnitten nachgewiesen werden. Interessanterweise führte die Reduktion der fibrillären extrazellulären Matrix nicht, was man intuitiv hätte erwarten können, zu einer Vermehrung der Fläche der sog. *optically empty spaces*, also der

elektronenoptisch leeren Bereiche. Diese Fläche korreliert mit der Abflussfazität des Kammerwassers (Lütjen-Drecoll 1973), wobei angenommen wird, dass ein großer Teil dieser Räume nicht wirklich leer ist, sondern mit Proteoglykanen gefüllt ist, die bei der üblichen Fixation für die Transmissionselektronenmikroskopie nicht erhalten werden (Tamm 2009). Wären die Räume tatsächlich leer, wären sie zu groß um den Abflusswiderstand zu erklären (Ethier et al. 1986). Sehr wahrscheinlich kommt es nach dem Verlust der fibrillären Matrix zu kompensatorischen Veränderungen des Volumens der angrenzenden Zellen, um insgesamt die Größe der Kammerwasserabflusswege und damit den Abflusswiderstand aufrechtzuerhalten.

Allerdings müssen auch die technischen Grenzen unserer Auswertung in Betracht gezogen werden, wie z.B. das Problem der Schnittebene der fibrillären Fasern. So resultiert ein Längsschnitt durch eine Faser in einem flächenmäßig höheren Grauwertanteil als dies bei einem Queranschnitt der Fall wäre. Da aber zum einen aus rein technischen Gründen keine exakte Übereinstimmung der Schnittebene zwischen den betrachteten Präparaten möglich ist, zum anderen in einem Netzwerk die Fibrillen in dreidimensional unterschiedlichen Richtungen verlaufen, kann dieser Fehler nur durch eine genügend große Anzahl an untersuchten Tieren behoben werden. Ferner muss in diesem Zusammenhang auch der segmentale Abfluss des Kammerwassers bedacht werden. Vranka et al. (2015) zeigten anhand von Perfusionsexperimenten mit fluoreszenz-markierten Mikrokügelchen, dass im menschlichen Auge der Kammerwasserabfluss entlang des Schlemm -Kanals nicht gleichmäßig erfolgt. Stattdessen konnten Regionen mit einem höheren Abfluss deutlich von Bereichen mit einem niedrigeren Abfluss abgegrenzt werden, wobei sich die beiden Areale auch bezüglich ihres Genexpressionprofils unterschieden. In der hier vorliegenden Studie wurden die ausgewerteten Bereiche randomisiert ausgewählt, d.h. der segmentale Abfluss wurde nicht berücksichtigt, was ebenfalls die statistische Power beeinflussen kann. Auch wenn in der Einzelanalyse zum Teil große Unterschiede zwischen dem experimentellen und dem Kontrollauge zu beobachten war, war allerdings die Standardabweichung unserer Untersuchung doch angemessen groß, so dass wir davon ausgehen, dass wir mit der Anzahl von 10 Tieren in jeder Gruppe eine genügend große statistische Power hatten.

Quantitative real-time RT-PCR Analysen des korneoskleralen Ringes bestätigten, dass durch eine Deletion von Fibronectin auch die Expression anderer fibrillärer

Komponenten der extrazellulären Matrix und Bindungspartner beeinträchtigt wird. So kam es bei Tieren mit einer Tamoxifen-induzierten Defizienz von Fibronektin zu einer signifikanten Reduktion des mRNA-Expressionsniveaus von Kollagen I und IV, sowie von Elastin.

Kollagen Typ I ist ein fibrilläres Protein, welches bei der Strukturbildung und mechanischen Zugfestigkeit der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle spielt (Kular et al. 2014). Vorangegangene Studien zeigten auf, dass für eine Polymerisation dieses Proteins die Präsenz eines Fibronektinnetzwerkes von entscheidender Bedeutung ist (Velling et al. 2002). Umgekehrt kann die Anlagerung von Kollagen I die Funktionalität von Fibronektin ebenfalls beeinflussen (Sottile et al. 2007). Im menschlichen Auge wird Kollagen I im Trabekelwerk, der Sklera, der *Lamina cribrosa* und im retrolaminären Bereich des Sehnervs exprimiert (Rehnberg et al. 1987). Im Trabekelwerk konnten VanderWyst et al. (2011) das Protein als Bestandteil der Basalmembran des Schlemm -Kanal Endothels identifizieren. Eine experimentell erzeugte Akkumulation von Kollagen des Typs I führt zu einem erhöhten Augeninnendruck, was zur Annahme führte, dass es beim Abflusswiderstand und beim Aufbau des intraokulären Drucks involviert ist (Aihara et al. 2003; Vranka et al. 2015). Unsere Befunde sprechen allerdings gegen diese Annahme und zeigen, dass die Defizienz von Fibronektin nicht nur posttranslational die Polymerisation von Kollagen I beeinflusst, sondern auch schon die Transkription seiner mRNA.

Kollagen vom Typ IV gilt als typisches Protein der Basallamina. Im Trabekelwerk ist es daher hauptsächlich Komponente der Basallamina von Schlemm -Kanal und der trabekulären Lamellen. Mit Hilfe von Immunogold-Färbungen konnte es jedoch auch als Bestandteil der extrazellulären Matrix im juxtakanalikulären Gewebe nachgewiesen werden (Hann et al. 2001). Filla et al. (2017) legten in *in vitro* Studien humaner Trabekelwerkszellen dar, dass die Hemmung einer Fibrillenbildung durch Fibronektin den Einbau von Kollagen IV in die extrazelluläre Matrix beeinträchtigt. In Übereinstimmung mit diesen Befunden konnten wir bei einer Defizienz von Fibronektin *in vivo* eine Reduktion der Kollagen IV Expression nachweisen.

Elastin – ein weiteres elementares Strukturprotein der extrazellulären Matrix – tritt häufig in Verbindung mit Kollagen auf und verleiht dem Gewebe ein gewisses Maß an Elastizität (Kular et al. 2014). Im Trabekelwerk bildet Elastin u.a. das Kernprotein der elastischen Fasern im cribriformen Plexus (Gong et al. 1989). Fibronektin stellt

einen Bestandteil der Hüllmembran dieser elastischen Fasern dar und steht so in direktem Zusammenhang mit dem Protein (Hann et al. 2001). Ferner tritt Elastin vereinzelt auch als Bestandteil des fein-fibrillären Gewebes entlang des Schlemm-Kanals auf. Studien konnten beim primären Offenwinkelglaukom eine vermehrte Menge dieses Proteins in der letztgenannten Region aufzeigen (Umihira et al. 1994).

Demgegenüber zog eine Deletion von Fibronectin keine Veränderungen des Expressionsniveaus von Fibrillin-1 und Integrin- β 1 nach sich.

Fibrillin-1 ist ein wichtiger Bestandteil von Mikrofibrillen und ebenfalls eine Komponente desjenigen Materials, welches im juxtakanalikulären Gewebe die Elastin-Fasern ummantelt (Kielty et al. 2002; Ueda et al. 2001). Unabhängige Untersuchungen zeigten auf, dass für den Einbau von Fibrillin-1 in die extrazelluläre Matrix ein Netzwerk aus Fibronectin-Fibrillen erforderlich ist (Sabatier et al. 2009; Filla et al. 2017). In unseren *in vivo* Untersuchungen führte allerdings ein Mangel an Fibronectin nicht zu einer reduzierten Expression von Fibrillin-1 mRNA, ganz im Kontrast zu Kollagen I, IV und Elastin. Die allgemeine Reduktion von fibrillären ECM Komponenten im juxtakanalikulären Trabekelwerk von Fibronectin-defizienten Tieren deutet allerdings darauf hin, dass - ähnlich wie *in vitro* - der posttranslationale Einbau von Fibrillin in die ECM gestört war.

Integrine sind transmembrane Zelloberflächenrezeptoren, welche eine Interaktion zwischen Zellen und deren umgebende extrazelluläre Matrix ermöglichen. Ein Heterodimer setzt sich jeweils aus zwei Untereinheiten (α und β) zusammen, deren Kombination die Spezifität für extrazelluläre Liganden und intrazelluläre Signalwege determinieren (Johansson et al. 1997). Der Hauptrezeptor für Fibronectin ist Integrin- α 5 β 1, wobei auch andere β 1-Integrine mit dem Glykoprotein interagieren können (α 3 β 1, α 4 β 1, α 8 β 1, and α V β 1). Unsere Untersuchungen zeigten, dass eine Deletion von Fibronectin keinen Einfluss auf die Expression der β 1-Integrine ausübt. In diesem Zusammenhang muss jedoch berücksichtigt werden, dass β 1-Integrine neben Fibronectin auch als Rezeptoren für andere Liganden fungieren. So binden zum Beispiel Vitronectin und Tenascin-C ebenfalls an Integrin- α 8 β 1 (Johansson et al. 1997). Eine Regulation ebendieser Faktoren könnte eine abweichende Expression von β 1-Integrinen nach sich ziehen und so den möglichen Effekt einer Fibronectin Defizienz „verschleiern“.

Die extrazelluläre Matrix des Trabekelwerks weist im Vergleich zur ECM anderer Gewebearten einige Besonderheiten auf: so sind Moleküle wie MMP-2 (matrix-metalloproteinase 2), Tenascin-C und α -SMA (α -smooth muscle actin) im Trabekelwerk stets sehr hoch exprimiert, während deren Proteingehalt im restlichen adulten Gewebe im Normalfall nur relativ gering ausgeprägt ist. Eine gesteigerte Expression dieser Komponenten weist auf eine erhöhte Umstrukturierung der extrazellulären Matrix hin, welche z.B. während der Entwicklung oder im Falle einer Erkrankung des betrachteten Gewebes auftritt. Folglich unterliegt die ECM des Trabekelwerks einem ständigen Auf- und Umbauprozess, welcher den Kammerwasserabfluss und die Aufrechterhaltung des intraokulären Drucks erst ermöglicht (Vranka et al. 2015). α -SMA – eine Aktinisoform, die vermehrt in vaskulären Muskelzellen vorkommt – wird außerdem von Zellen exprimiert, die in kontraktile Mechanismen involviert sind (Wang et al. 2006). Pattabiraman & Rao (2010) konnten in *in vitro* Studien einen direkten Zusammenhang zwischen Fibronectin und α -SMA aufstellen. So erhöht Fibronectin in humanen Trabekelwerkzellen signifikant die Expression von α -SMA. Demgegenüber zeigten unsere Untersuchungen, dass eine Deletion von Fibronectin *in vivo* den Proteingehalt von α -SMA nicht relevant beeinflusst. Dies weist darauf hin, dass – unabhängig von Fibronectin – andere Faktoren oder Proteine auf die Kontraktilität des Trabekelwerks einwirken.

Sowohl die Zusammensetzung, als auch die Physiologie der extrazellulären Matrix im Trabekelwerk können den Kammerwasserabfluss und IOD beeinflussen. So geht eine erhöhte Rigidität des extrazellulären Netzwerks mit einem verminderten Kammerwasserabfluss einher (Swaminathan et al. 2014). Eine gesteigerte Aktivität von Matrix-Metalloproteasen erhöht die Abflussfaszilität (Bradley et al. 1998).

Aufgrund seines modularen Aufbaus besitzt Fibronectin die Fähigkeit mit vielen verschiedenen Bindungspartnern zu interagieren. Die Tatsache, dass eine Deletion von Fibronectin eine Reduktion der fibrillären extrazellulären Matrix in der juxtakanalikulären Region des Trabekelwerks sowie eine Veränderung im Expressionsniveau ausgewählter ECM-Komponenten mit sich bringt, legt die Vermutung nahe, dass das Glykoprotein als Modulator der extrazellulären Matrix auf den Kammerwasserabfluss Einfluss nimmt. Unsere Untersuchungen offenbarten jedoch, dass eine Defizienz des Glykoproteins, und dadurch bedingt anderer

fibrillärer Komponenten der ECM, zu keiner relevanten Abweichung des intraokulären Drucks führt. Folglich spielt Fibronectin bei der Aufrechterhaltung des IOD nur eine untergeordnete Rolle. Möglicherweise wird der Mangel des Glykoproteins auch durch eine Überexpression anderer, nicht fibrillärer Komponenten der ECM ausgeglichen. So legen vorangegangene Daten nahe, dass Proteoglykane den Abflusswiderstand im Trabekelwerk bedingen. Diesbezüglich konnte in Organkultur eine Hemmung der Biosynthese von Glykosaminoglykanen die Abflussfaszilität des Kammerwassers erhöhen. Interessanterweise war hierbei zum Teil auch die Lokalisation von Fibronectin verändert. Während das Glykoprotein im Kontrollauge im gesamten Trabekelwerk exprimiert wurde, war es nach einer Behandlung mit Glykosaminoglykan-Synthese-Hemmern nur noch im Randbereich der Trabekel nachweisbar (Keller et al. 2008).

Im direkten Vergleich zu vorangegangenen Untersuchungen war der gemessene intraokuläre Druck in dieser Studie deutlich höher. So wurde von Cone und Kollegen in C57BL / 6 Mäusen ein IOD von $10,4 \pm 2,9$ mmHg berichtet (Cone et al. 2012). Unsere Untersuchungen hingegen ergaben in der Kontrollgruppe einen mittleren Druckwert von $15,8 \pm 0,4$ mmHg. Grund für diese Abweichungen könnte die vorangegangene mehrtägige Behandlung von neugeborenen Tieren mit Tamoxifen, welches in Maiskeimöl gelöst wurde, sein. Tamoxifen zeigt bei seiner Anwendung am Menschen als selektiver Estrogenrezeptormodulator eine Reihe von Nebenwirkungen, die u.a. durch seine Interaktion mit Geschlechtshormonen bedingt sind. Klinische Studien verzeichneten in Brustkrebspatienten, die im Rahmen ihrer Erkrankung mit Tamoxifen behandelt wurden, ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Augenerkrankungen. So konnten vermehrt kristalline Netzhautablagerungen, Makulaödeme, Hornhautveränderungen, sowie die Ausbildung eines Katarakts vermerkt werden (Nayfield & Gorin 1996; Paganini-Hill & Clark 2000). Allerdings traten diese Nebenwirkungen nach Langzeitbehandlung auf, während wir nur kurzfristig Tamoxifen applizierten. In diesem Zusammenhang ist auch von Interesse, dass Boneva et al. (2016) im Mausmodell keine pathologischen Abweichungen der Morphologie und Funktion der Retina nach einer Behandlung mit Tamoxifen beobachten konnten. Nichtsdestotrotz könnte die Anwendung von Tamoxifen in den Tagen unmittelbar nach der Geburt, in denen es zur abschließenden Morphogenese der trabekulären Abflusswege kommt, zu zellbiologischen Veränderungen führen, die insgesamt einen höheren Abflusswiderstand und damit erhöhten Augeninnendruck

zur Folge haben. Solche Veränderungen könnten auch in der Hornhaut auftreten, und dadurch unsere tonometrischen Messungen des IOD beeinflussen. So ist gut dokumentiert, dass z.B. die Hornhautdicke die applanationstonometrisch gemessene Höhe des IOD beeinflusst (Doughty & Zaman 2000). Unabhängig von der Wirkung des Tamoxifens kann überdies ein Einfluss des Maiskeimöls auf die postnatale Entwicklung bzw. physiologische Eigenschaft von Kornea und Sklera nicht ausgeschlossen werden. Ferner kann auch eine unterschiedliche Kalibrierung der verwendeten Geräte (Tonometer) die Messwerte beeinträchtigen. Da allerdings auch die Kontrolltiere gleichermaßen behandelt wurden, sollten solche, bislang bezüglich ihrer Natur nicht einschätzbaren Veränderungen, keinen Einfluss auf die Ergebnisse und Schlussfolgerungen unserer Arbeit haben. Ein erster Ansatz wäre sicher direkt Kammerwasserabflussfazität der trabekulären Abflusswege zu messen, da ein erhöhter Augendruck prinzipiell auch durch andere Faktoren, wie Sekretion des Kammerwassers, beeinflusst werden kann.

4.3 Die Rolle von Fibronektin beim primären Offenwinkelglaukom

Beim primären Offenwinkelglaukom (POWG) kommt es im juxtakanalikulären Gewebe typischerweise zu einer Akkumulation von fibrillärer extrazellulärer Matrix, dem sog. Plaque-Material, welches aus den Hüllproteinen der elastischen Fasern besteht, welche wiederum Kollagen Typ VI und Fibronektin beinhalten (Tamm & Fuchshofer 2007). Um eine ähnliche Akkumulation von fibrillärer extrazellulärer Matrix zu induzieren generierten Junglas et al. (2012) transgene β B1-CTGF Mäuse (mit dem genetischen Hintergrund FVB/N x CD1) welche über linsensspezifische Überexpression CTGF (*connective tissue growth factor*) vermehrt ins Kammerwasser sezernieren. Die Sekretion von CTGF in das Kammerwasser führte hierbei zu einer Vermehrung von Fibronektin und α -SMA im Kammerwinkel. Diese Veränderungen gingen mit einem signifikanten Anstieg des IOD und einer Reduktion der Axonanzahl im Sehnerv nach nur 4 Lebenswochen einher. Insgesamt ist diese Mauslinie eines der wenigen Tiermodelle des POWG.

Ziel unserer Untersuchungen war es der Frage nachzugehen, ob durch eine Deletion von Fibronektin, und damit der Verhinderung seiner Vermehrung unter Kontrolle von transgenem CTGF, auch eine Erhöhung des IOD verhindert werden kann. Dazu

musste allerdings der genetische Hintergrund der CTGF überexprimierenden Tiere prinzipiell von FVB/N x CD1 in C57/BL6 x CD1 geändert werden. Die danach erhobenen Befunde deuten darauf hin, dass im β B1-CTGF Mausmodell die Abweichungen im IOD und die Ausprägung des Sehnervenschadens erheblich von der Wahl des genetischen Hintergrunds der Mauslinie abhängig sind. Für diese Hypothese spricht unsere Beobachtung eines, im Vergleich zu den Daten von Junglas et al., deutlich zeitverzögerten und relativ gering ausgeprägten Sehnervenschadens. So wies ein paarweiser Vergleich (statistischer t-Test) zwischen $F_n^{fl/fl}$ und β B1-CTGF / $F_n^{fl/fl}$ Tieren zunächst darauf hin, dass langfristig auch in CD 1 x C57BL / 6 Mäusen eine linsenspezifische Überexpression von CTGF zu einem signifikanten Sehnervschaden führt (Abb. 20). Ein multivarianter Vergleich (einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni) hingegen konnte diese Annahme nicht bestätigen (Abb. 24). Um diesen Aspekt eindeutig zu klären, ist die Auswertung von Sehnerven weiterer Tiere und die Erhöhung der statistischen Power notwendig, welches uns im zur Verfügung stehenden Zeitrahmen nicht mehr möglich war. Zudem konnten wir - im Gegensatz zu den Untersuchungen von Junglas et al. (2012) - zwischen den $F_n^{fl/fl}$ und β B1-CTGF / $F_n^{fl/fl}$ Tieren zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied im IOD dokumentieren. Grund für die eingeschränkte Schädigung des Sehnervs bzw. die fehlende Abweichung bezüglich des IOD ist sehr wahrscheinlich die Divergenz des genetischen Hintergrunds der verwendeten Mauslinien. Savinova et al. (2001) konnten anhand ihrer Studie nachweisen, dass die intraokulären Druckwerte verschiedener Mauslinien voneinander abweichen. Ferner variierte in einem experimentellen Glaukommodell die Ausprägung des beobachteten Sehnervenschadens ebenfalls in Abhängigkeit von dem genetischen Hintergrund der Mauslinie. In diesem Zusammenhang konnte in CD 1 Tieren ein deutlich höherer prozentualer Axonverlust verzeichnet werden als dies in C57BL / 6 Mäusen der Fall war (Cone et al. 2010). Tiere, die in der hier vorliegenden Studie in die Auswertung miteinbezogen wurden, waren mindestens bis zur 3. Generation in die C57BL / 6 Mauslinie rückgekreuzt. Dies könnte ein möglicher Grund für einen vergleichsweise abgeschwächten Sehnervenschaden sein (Cone et al. 2010). Ähnlich wie in den C57BL / 6 Tieren (vgl. oben) waren in CD 1 x C57BL / 6 Mäusen die intraokulären Druckwerte im Vergleich zu Befunden anderer Arbeitsgruppen insgesamt relativ hoch. Während dieser in vorangegangenen Studien in C57BL / 6 Mäusen $10,4 \pm 2,9$ mmHg und in CD 1 Tieren $10,3 \pm 3,3$ mmHg betrug (Cone et al. 2012), verzeichneten

wir im Alter von 5-6 Wochen in der Kontrollgruppe einen durchschnittlichen Wert von $17,5 \pm 0,6$ mmHg. Der intraokuläre Druck wird von vielen verschiedenen Faktoren beeinflusst. So spielt u.a. die Art der Anästhesie während der Druckmessungen eine gewisse Rolle. Cone et al. (2012) dokumentierten in diesem Zusammenhang zwischen einer tiefen Narkose (Ketamin / Xylazin / Acepromazin, intraperitoneal verabreicht) und einer Betäubung durch Isofluran-Inhalation einen Druckunterschied von mindestens 2,2 mmHg. Während obige Richtwerte unter einer Ketamin / Xylazin / Acepromazin Anästhesie ermittelt wurden, erfolgten die Druckmessungen in dieser Studie mittels Betäubung durch Isofluran. Trotz der Berücksichtigung dieser Diskrepanzen weichen die Druckwerte trotzdem erheblich von Ergebnissen anderer Gruppen ab. Der Grund für diese Befunde könnte auch hier – wie bereits unter 4.2 beschrieben – eine entsprechende Einwirkung von Tamoxifen bzw. des Maiskeimöls oder eine abweichende Tonometer-Kalibrierung sein.

Trotz der Unterschiede in Sehnervenschaden und IOD konnten wir allerdings, genau wie Junglas et al., eine ausgeprägte Vermehrung von α -SMA und Fibronektin im Trabekelwerk von C57/BL6 x CD1 Mäusen mit einer linsenspezifischen Überexpression von CTGF beobachten. Dies spricht für eine Funktionalität des β B1-CTGF Mausmodells unabhängig von der verwendeten Mauslinie.

Insgesamt muss festgestellt werden, dass mit Hilfe von β B1-CTGF / Fn^{fl/fl} Tieren nicht die Frage geklärt werden kann inwieweit eine Deletion von Fibronektin den progressiven Verlauf der Glaukomerkrankung im β B1-CTGF Mausmodell beeinflusst. Folgende Aspekte sprechen für diese Annahme: 1. Eine Deletion von Fibronektin in Tieren mit einer linsenspezifischen Überexpression von CTGF geht mit keinem signifikant verminderten Sehnervenschaden einher. 2. Ein Mangel an Fibronektin hat keine Auswirkungen auf den IOD der Tiere.

Allerdings unterstützen unsere Befunde an β B1-CTGF / Fn^{fl/fl} Tieren durchaus unsere Schlussfolgerung, dass Fibronektin *per se* keinen Einfluss auf den IOD bzw. den trabekulären Abflusswiderstand nimmt. So führte die linsenspezifische Überexpression von CTGF *per se* zu einer Zunahme der Fibronektinmenge im Trabekelwerk von β B1-CTGF / Fn^{fl/fl} Tieren, genau wie von Junglas et al. bei β B1-CTGF Tieren beschrieben, welche nun über das Tamoxifen-induzierbare Cre / loxP System deutlich reduziert werden konnte. So zeigten immunhistochemische Untersuchungen im Vergleich zu β B1-CTGF / Fn^{fl/fl} Mäusen eine dramatisch

verminderte Menge von Fibronektin im Trabekelwerk von β B1-CTGF / CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren an.

4.4 Die Rolle von Fibronektin in der Niere

In Zusammenhang mit den Untersuchungen am Auge konnte nach einer Tamoxifen-Behandlung von CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren eine erhöhte Mortalitätsrate festgestellt werden. Eine nähere Untersuchung der Tiere zeigte, dass die ubiquitäre Deletion von Fibronektin ab dem postnatalen Tag 1 zur Bildung zystischer Veränderungen in der Niere führt. Folgende Punkte sprechen dafür, dass diese Veränderungen primär durch eine Fibronektindefizienz der Niere hervorgerufen werden und nicht sekundär durch pathologische Veränderungen anderer Organe ausgelöst wird: 1. Quantitative real-time RT-PCR, sowie Western Blot Analysen und immunhistochemische Färbungen bestätigten eine signifikante Reduktion der Fibronektinmenge in der Niere von CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Mäusen nach der Applikation von Tamoxifen-Augentropfen. 2. Eine eingehende histologische Untersuchung weiterer Organe - wie Herz, Lunge, Leber, *Glandula submandibularis*, Milz und Thymus - ließ keine morphologischen Veränderungen erkennen.

Zwei Möglichkeiten müssen als Ursache dieser Veränderungen in Betracht gezogen werden. So kann die durch eine Tamoxifengabe ausgelöste Fibronektin-Defizienz zur fehlerhaften Tubulogenese führen, die erst in der ersten Woche nach Geburt komplett abgeschlossen wird (Wu et al. 2013). Alternativ kann auch ein Mangel an Fibronektin *per se* zu entsprechenden pathologischen Veränderungen in der Niere nach bereits abgeschlossener Morphogenese führen.

4.4.1 Fibronektin und die postnatale Nierenentwicklung

Folgende Aspekte sprechen für eine Fehlentwicklung der Niere als Ursache für die Entstehung der renalen Zysten: 1. *In vitro* Studien zeigten auf, dass Fibronektin positiv auf die Verzweigung der Ureterknospe und die Tubulogenese – und somit auf die Entstehung neuer Nephrone – einwirkt (Ye et al. 2004; Jiang et al. 2000).

2. Hartman et al. (2007) beobachtete in Mäusen während der ersten Tage nach der Geburt eine finale, vermehrte Neubildung von Nephronen, als Zeichen des Abschlusses der Tubulogenese. 3. *In vivo* führt eine Defizienz von Fibronektin nur bei

einer Deletion während der ersten Lebenswoche (P1 bzw. P5) zu pathologischen Veränderungen. Eine Deletion des Glykoproteins ab dem postnatalen Tag 10 (oder später) resultiert auch 6 Wochen nach der Applikation von Tamoxifen in keine Zystenbildung.

Wurden die Tiere ab dem postnatalen Tag 1 mit Tamoxifen-Augentropfen behandelt, traten die ersten Veränderungen in der Niere am postnatalen Tag 4 auf. Bei der Interpretation dieser Befunde muss jedoch eine mögliche zeitliche Verzögerung der (Deletions-)Wirkung aufgrund des induzierbaren Systems mit einkalkuliert werden. Hayashi & McMahon (2002) postulierten anhand ihrer Studien in CAGG-Cre-ERTM / R26R Mäusen (Reportermauslinie) eine zeit- und dosisabhängige Rekombinationswirkung von Tamoxifen. Die Wissenschaftler wiesen bereits 24 h nach einer intraperitonealen Tamoxifen-Injektion erste Rekombinationsereignisse nach. Inwieweit der zeitlich bedingte Effekt in der Niere bei einer Applikation von Tamoxifen mittels Augentropfen abweicht, müsste in weiteren Untersuchungen anhand von Reportermäusen überprüft werden.

Zudem muss in Betracht gezogen werden, dass für die Ausbildung renaler Zysten zunächst Fibronectin, welches bereits während der Embryonalphase in die extrazelluläre Matrix implementiert wurde, abgebaut werden muss. Bisherige Literaturrecherchen konnten keinen eindeutigen Hinweis auf die Halbwertszeit von Fibronectin in der Niere liefern. *In vitro* Studien in Fibronectin-defizienten Zellen dokumentierten jedoch bereits 23 h nach Entfernen des Glykoproteins vom Nährmedium eine 65 % ige Reduktion von matrix-assoziierten Fibronectin (Sottile & Hocking 2002). Da jedoch *in vivo* mittels eines induzierbaren Systems keine *absolute Deletion*, sondern lediglich eine Verringerung des Expressionsniveaus erreicht werden kann, ist eine prolongierte Halbwertszeit sehr wahrscheinlich. Auch muss, wie bereits oben erwähnt, eine zunehmende posttranslationale Vernetzung von Fibronectin durch Transglutaminasen in Betracht gezogen werden, was die Halbwertszeit von Fibronectin in der Niere weiter verlängern dürfte.

Angenommen die Tamoxifenbehandlung unmittelbar nach der Geburt führt zu einer signifikanten Fibronectindefizienz bereits vier Tage nach der Geburt, ist ein daraus resultierender Defekt der abschließenden Tubulogenese durchaus eine Möglichkeit zur Erklärung der zystischen Veränderungen. Hartman et al. (2007) konnten in diesem Zusammenhang aufzeigen, dass in Mäusen der Linie CD 1 bis zum

postnatalen Tag 3 die Nephrogenese bzw. die Aufzweigung der Ureterknospe weitestgehend abgeschlossen ist. Dies geht mit einer finalen, vermehrten Neubildung von Nephronen einher. Da vermutlich auch in der Entwicklung Unterschiede zwischen den verschiedenen Mauslinien berücksichtigt werden müssen, könnte eine – im Vergleich zu CD 1 Mäusen - leicht verzögerte Morphogenese in C57BL/ 6 Tieren ebendiesen Zeitrahmen umfassen (Chahoud & Paumgarttem 2017). Beeinträchtigt die Defizienz von Fibronektin die Funktionalität der Ureterknospe und schränkt deren Fähigkeit z.B. bei der Erhaltung des metanephrogenen Blastems ein, könnte dies zu den beobachteten pathologischen Veränderungen führen. Ye et al. (2004) postulierten in ihren Studien, dass Fibronektin während der Embryonalphase eine Verzweigung der Ureterknospe positiv beeinflusst. Des Weiteren fördert das Glykoprotein in MDCK-Zellen die Tubulogenese (Jiang et al. 2000). Folglich wirkt Fibronektin essentiell auf die Neuentstehung von Nephronen ein, welche in dieser „finalen Phase“ nochmals vermehrt produziert werden.

Gegen diese Theorie spricht allerdings die Tatsache, dass eine Applikation von Tamoxifen ab dem postnatalen Tag 5 ebenfalls zu einer renalen Zystenbildung führt. Demnach müsste die postnatale Entwicklung in CD 1 und C57BL / 6 Mäusen um mindestens 48 h voneinander abweichen. Im Vergleich hierzu zeigten DBA/2J und NMRI Mausembryos einen entwicklungsbedingten Unterschied von ungefähr 12 h (Chahoud & Paumgarttem 2017). Andererseits bekundeten Wu et al. (2013) in C57BL / 6 Mäusen erst zwischen dem postnatalen Tag 5 und 7 einen Rückgang der Expression von Genen, die in die Organogenese und embryonale Entwicklung der Niere involviert sind.

Interessanterweise traten die entsprechenden pathologischen Veränderungen in der Niere nicht auf, wenn Fibronektin nach dem postnatalen Tag 10 deletiert wurde. CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Mäuse, die ab dem postnatalen Tag 1 oder 5 mit Tamoxifen behandelt wurden, wiesen bereits 14 Tage nach Applikationsbeginn sehr ausgeprägte, renale Zystennieren auf. Demgegenüber konnte in Tieren mit einer Fibronektin-Defizienz ab dem postnatalen Tag 10 auch nach 6 Wochen keine Abnormität des Nierengewebes festgestellt werden. Quantitative real-time RT-PCR Analysen bestätigten zu diesem Zeitpunkt zwar eine höchst signifikante Reduktion der renalen Fibronektin mRNA in CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren, allerdings wiesen die immunhistochemischen Untersuchungen nur auf eine moderate Verringerung des

Glykoproteins in der Niere hin. Grund hierfür könnte eine verstärkte Vernetzung von Fibronectin in der extrazellulären Matrix sein, die durch den induzierten Mangel impliziert wird. In diesem Zusammenhang spielt möglicherweise die *Tissue Transglutaminase* eine entscheidende Rolle – ein Enzym, welches nachweislich an Fibronectin binden und ECM-Komponenten vernetzen kann (Akimov et al. 2000). Eine verstärkte Implementation des Glykoproteins könnte dessen Abbau zeitlich verzögern bzw. verhindern. Für eine genauere Analyse diesbezüglich müssten Mäuse ab dem postnatalen Tag 10 mit Tamoxifen-Augentropfen behandelt und die Niere zu einem späteren Zeitpunkt (z.B. nach 6 Monaten) untersucht werden.

4.4.2 Fibronectin im Kontext der polyzystischen Nierenerkrankung

Ferner konnten bei der genaueren Analyse des renalen Phänotyps folgende Parallelen zur polyzystischen Nierenerkrankung beobachtet werden: 1. Neuere Studien weisen auf einen essentiellen Einfluss des Interstitiums bei der Entwicklung von polyzystischen Nierenerkrankungen hin (Nie & Arend 2017; Gong et al. 2018). In Übereinstimmung mit diesen Befunden geht die Deletion von Fibronectin mit einer Aufweitung des renalen Interstitiums einher. 2. Zystennieren zeigen meist eine gesteigerte Ablagerung von extrazellulärer Matrix und Fibrose (Norman 2011). Dementsprechend führte die Deletion von Fibronectin langfristig ebenfalls zu einer Akkumulation von Kollagenen. 3. Proteomanalysen ließen bei einer polyzystischen Nierenerkrankung eine Dysregulation ausgewählter Proteine erkennen (Saito et al. 2017; Si et al. 2009). Die Expression ebendieser war teilweise auch nach einer Deletion von Fibronectin verändert. 4. Studien in Mausmodellen polyzystischer Nierenerkrankungen zeigten, dass das Auftreten bzw. die Ausprägung der Zysten vom Zeitpunkt der jeweiligen Gendeletion abhängig ist (Lantinga-van leeuwen et al. 2007; Rützler et al. 2017). Ebenso resultierte eine Defizienz von Fibronectin ab dem postnatalen Tag 1 bzw. 5 in eine relativ schnelle Zystenbildung. Eine Deletion des Glykoproteins ab dem postnatalen Tag 10 hingegen ging auch nach 6 Wochen mit keiner pathologischen Veränderung des Nierenparenchyms einher.

Renale Zysten resultieren größtenteils aus einer pathologischen Veränderung verschiedener Anteile des Nephrons, wobei primär das Tubulus- und Sammelrohrsystem betroffen sind. In der *cpk*-Maus – ein Modell für die ARPKD des Menschen – dominieren erweiterte Sammelrohre die Erkrankung. Demgegenüber

treten im *pcy*-Mausmodell, dessen Symptomatik dem Krankheitsbild einer ADPKD sehr ähnelt, die ersten Zysten in den proximalen und distalen Tubuli auf, wobei im weiteren Krankheitsverlauf sämtliche Nephronsegmente betroffen sind (Schieren et al. 1996).

In der hier vorliegenden Studie konnten licht- und elektronenmikroskopische Analysen keinen eindeutigen Hinweis auf die renale Ursprungsstruktur der Zysten liefern. Während am postnatalen Tag 4 und 8 längs der Zysten lediglich eine Auflockerung des interstitiellen Gewebes beobachtet werden konnte, umschloss nach 5-6 Wochen eine einschichtige, epithel-ähnliche Struktur die Zyste. Elektronenmikroskopische Untersuchungen ließen zum Teil eine direkte Verknüpfung der Zellen längs der Zyste erkennen. Dies könnte auf ein fehlerhaft gebildetes oder de-differenziertes Epithel hindeuten. Gegen diese Annahme spricht, dass fluoreszenzbasierte Analysen keinen Hinweis auf typische Charakteristika von Epithelzellen entlang der Zysten liefern. So konnten immunhistochemische Färbungen gegen E-Cadherin keine Zell-Zell-Verbindungen entlang der Zystenbegrenzung bestätigen. Allerdings wird dieses Transmembranprotein in den proximalen Tubuli nur sehr schwach exprimiert (Prozialeck et al. 2004). Überdies legten Wu et al. (1998) dar, dass die *Integrin-gekoppelte Kinase* (ILK) sowohl auf die Fibronektin Matrix, als auch auf die Expression von E-Cadherin Einfluss nimmt. Sollte sich eine Deletion von Fibronektin auf die Aktivität der ILK auswirken, kann dies eine abweichende E-Cadherin Menge zur Folge haben. Eine zusätzliche Färbung gegen ZO-1 (Zona Occludens-1) – ein Protein der Tight Junctions – könnte in diesem Zusammenhang über eventuelle Zellverbindungen aufklären. Nichtsdestotrotz sprechen die immunhistochemischen Analysen bezüglich Kollagen IV und Laminin gegen die Präsenz einer Basallamina entlang der Zyste - und somit auch gegen eine *Epithelialisierung* des erkrankten Gewebes. Möglicherweise geht der Mangel an Fibronektin jedoch mit einer Transdifferenzierung von tubulären Epithelzellen und dem Verlust von deren spezifischen Zelleigenschaften einher. Diesbezüglich konnte in klinischen Untersuchungen mittels einer Rasterelektronenmikroskopischen Analyse teilweise eine Verbindung der Zyste zum Tubulussystem dokumentiert werden (Grantham et al. 1987). Eine lichtmikroskopische Begutachtung von Serienschnitten der Zystenregion ließ in der hier vorliegenden Studie keine Fusion der Zysten mit einer tubulären Struktur erkennen. Dieser Befund deutet darauf hin,

dass Transdifferenzierungsprozesse von tubulären Epithelzellen in diesem Fall nicht in die Entstehung der renalen Zysten involviert sind.

Anhand einer immunhistochemischen Färbung gegen CD31 (Endothelzellen), Calbindin (distaler Tubulus), Megalin (proximaler Tubulus) und Aquaporin-2 (Sammelrohr) konnten wir die Zystenentstehung aufgrund einer Aufweitung von Blutgefäßen und tubulärer Strukturen ausschließen. Färbungen gegen NKCC-2 (Na-K-2Cl Kotransporter) – ein Transportprotein, welches im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife exprimiert wird – ergaben ebenfalls kein positives Fluoreszenzsignal (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen entlang der Zysten ein positives Signal für PDGFR- β . Die Deletion von Fibronektin zieht also eine Aufweitung des Interstitiums nach sich. Neuere Studien deuten auf einen essentiellen Einfluss des Interstitiums auf die Entwicklung polyzystischer Nierenerkrankungen hin. So resultiert eine Deletion von Polycystin-1 im renalen Stroma in eine Zystenbildung. Interessanterweise konnte hierbei u.a. eine verminderte Expression von Fibronektin beobachtet werden. Polycystin-1 fungiert als Rezeptor verschiedener ECM Komponenten und ist so in die Regulation der extrazellulären Matrix involviert. In diesem Mausmodell traten die ersten Zysten im Alter von 3-5 Wochen auf und waren sowohl im Kortex, als auch in der Medulla lokalisiert (Nie & Arend 2017). Eine Defizienz der Integrin-gekoppelten Kinase (ILK) im renalen Stroma der Mausniere führt ebenfalls zu einer Bildung von Zysten, die mit einer hohen Mortalitätsrate innerhalb der ersten drei Lebenswochen einhergeht. Die ILK ist in Signalkaskaden involviert, die durch Integrine vermittelt werden und beeinflusst daher teilweise auch den Wirkmechanismus von Fibronektin. Eine Deletion der ILK führt bereits ab Embryonaltag 16,5 zu einer Zystenbildung an der Medulla-Kortex-Grenze, wobei im weiteren Krankheitsverlauf die Zysten weitestgehend in der Medulla lokalisiert sind. Interessanterweise konnten auch in dieser Studie längs der Zyste keine endothelialen oder epithelialen Zellen dokumentiert werden (Gong et al. 2018). Die Tatsache, dass ILK die Implementierung von Fibronektin in die extrazelluläre Matrix reguliert, spricht hinsichtlich der pathologischen Veränderungen für eine Korrelation dieser beiden Komponenten (Wu et al. 1998). Folglich könnte die eingeschränkte Interaktion von Fibronektin mit Polycystin-1 und / oder ILK zu einer Bildung von Zysten beitragen.

Darüber hinaus offenbarten Untersuchungen in Mäusen mit einer Deletion von Polycystin-1 und Integrin- β 1 im Sammelrohr einen direkten Zusammenhang zwischen diesen beiden Proteinen. So zeigte sich, dass die zusätzliche Deletion von Integrin- β 1 die Zystenbildung in Polycystin-1 defizienten Tieren abschwächen kann. Dies weist darauf hin, dass die durch Integrin- β 1 induzierten Signalkaskaden an der Entwicklung der Zysten beteiligt sind. Man vermutet, dass Polycystin-1 regulatorisch auf die Interaktion von Integrinen mit der extrazellulären Matrix – und somit auch Fibronektin – einwirkt. Eine Kolo-kalisation der beiden Rezeptoren spricht für diese Theorie (Lee et al. 2015).

Schlussendlich sind jedoch verschiedene Mechanismen an der Entstehung von Nierenzysten beteiligt. So kann eine Hyperplasie, d.h. die Vergrößerung eines definierten Nephronabschnitts aufgrund einer abnormen Vermehrung von Epithelzellen, mit der Bildung einer Zyste einhergehen. Des Weiteren deuten *in vitro* Studien darauf hin, dass bei der ADPKD eine Transformation von gesunden, absorbierenden Epithelzellen zu einem zystischen, sekretorischen Epithel auftritt. Hierdurch kommt es zu einer Ansammlung von Flüssigkeit, die einerseits den Kollaps der Zyste verhindert, andererseits die Epithelzellen zu einer weiteren Sekretion anregt. Diese Prozesse können – ebenso wie der Verlust der Polarität tubulärer Epithelzellen – durch eine abweichende Zell-Zell- und Zell-Matrix Interaktion hervorgerufen werden (Murcia et al. 1999; Calvet 1993). Da Fibronektin eine regulatorische Rolle auf die Zell-Matrix-Adhäsion ausübt, könnte die Deletion des Glykoproteins durchaus zu entsprechenden Veränderungen von Zelleigenschaften beitragen.

Bei einer Nierenschädigung treten zudem häufig fibrotische Veränderungen des renalen Gewebes auf. Auch Zystennieren zeigen meist eine gesteigerte Ablagerung von extrazellulärer Matrix und Fibrose (Norman 2011). Im Mausmodell geht eine Sammelrohr-spezifische Deletion von PKD-1 insbesondere im Bereich der Zysten mit einer erhöhten Proteinmenge von α -SMA einher, was auf eine Fibrose hinweist (Lee et al. 2015). Sowohl histologische Untersuchungen (Pikro-Siriusrot-Färbung), als auch Proteomanalysen belegten, dass eine ubiquitäre Deletion von Fibronektin langfristig in eine Akkumulation von Kollagenen resultiert. In diesem Zusammenhang konnten bei den CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren jedoch große Unterschiede hinsichtlich der Ausprägung beobachtet werden. Grund hierfür ist zum Teil sicherlich

die Tatsache, dass in dieser Studie ein induzierbares System zum Einsatz kam. Dadurch kann es – auch bei gleicher Ausführung – zu Abweichungen bezüglich der Induktionsfunktionalität kommen. Hierbei steht der Grad der Fibronektin-Defizienz möglicherweise direkt mit der Intensität der Fibrose in Verbindung. Des Weiteren wurden in die Analysen Männchen und Weibchen in gleicher Weise miteinbezogen. Si et al. (2009) konnten jedoch sowohl in gesunden, als auch erkrankten Nieren geschlechtsspezifische Expressionsunterschiede nachweisen. Ferner waren in einem ADPKD-Nagermodell die pathologischen Veränderungen in Männchen viel ausgeprägter als dies bei den weiblichen Tieren der Fall war. Erstere waren demnach früher von einer Niereninsuffizienz betroffen (Cowley et al. 1997). Ein ähnlicher geschlechtsspezifischer Unterschied könnte auch in der vorliegenden Studie eine Rolle spielen.

Nach einer Deletion von Fibronektin war im adulten Tier längs der Zyste keine erhöhte Menge an α -SMA – und somit keine Aktivierung von Myofibroblasten wie sie häufig bei einer Fibrose auftritt – erkennbar. Stattdessen zeigte sich in der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung teilweise eine Ansammlung von filamentösem Aktin. ILK-defiziente Stroma-Zellen akkumulierten ebenfalls diese Form des Aktins in ihrem Randbereich, wobei die Zellen im Vergleich zur Kontrolle weniger Auswüchse zeigten. Die Wissenschaftler schlossen aufgrund dieser Beobachtung auf eine reduzierte Zelladhäsion (Gong et al. 2018). Die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion spielt jedoch bei der Initiierung und Aufrechterhaltung der Polarität einer Zelle eine wichtige Rolle (Murcia et al. 1999). Fischer et al. (2006) konnten im Mausmodell eine klare Korrelation zwischen der polyzystischen Nierenerkrankung und einem Verlust der Zellpolarität nachweisen. Weiterführende Studien zeigten hingegen, dass eine Beeinträchtigung orientierter Zellteilung, die mit der Zellpolarität in direktem Zusammenhang steht, zwar häufig eine Begleiterscheinung, jedoch keine Ursache für eine Zystenbildung darstellt (Nishio et al. 2010).

Proteomanalysen zeigten nach einer Deletion von Fibronektin deutliche Umstrukturierungs- und Expressionsabweichungen in der Niere an. Auffällig hierbei war vor allem der Anstieg verschiedener Kollagene sowie weiterer Komponenten der extrazellulären Matrix. Dies deutet – ebenso wie die Pikro-Siriusrot-Färbung - auf eine Nierenfibrose hin. Übereinstimmend mit Untersuchungen in verschiedenen Mausmodellen der polyzystischen Nierenerkrankung war nach einer Deletion von

Fibronektin u.a. der Proteingehalt von Kollagen 12a1, Fibulin-5, Vimentin, Fibrinogen und der Kreatin-Kinase des Typs B erhöht (Saito et al. 2017; Han et al. 2008).

Ähnlich wie die Western Blot Auswertungen bestätigten die Proteomanalysen eine Reduktion des renalen Fibronektins in den CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren. Die Abnahme von Faktoren, welche möglicherweise bei der Entstehung der Sammelrohre (ALDR) und renalen Tubuli (GPC4) involviert sind, sprechen für einen entwicklungsbedingten Phänotyp. Ferner konnten Ishimoto et al. (2017) nachweisen, dass Abnormalitäten, welche die Mitochondrien betreffen, die Entwicklung renaler Zysten beeinflussen. In diesem Zusammenhang war nach einer Deletion von Fibronektin ein Rückgang mehrerer Proteine, die am Mitochondrium lokalisiert sind, erkennbar (ACOT9, ABCBA, IDHG1). Des Weiteren konnten im Vergleich zur Kontrolle auch diverse Abweichungen bezüglich des Zellstoffwechsels dokumentiert werden. Folglich gehen die morphologischen Veränderungen mit einer abnormalen Proteinexpression einher, die teilweise die physiologischen Prozesse in der Zelle beeinträchtigt und in Verbindung mit polyzystischen Nierenerkrankungen häufiger auftritt.

Die Funktionalität der Nieren wurde mittels einer Untersuchung von Urinproben (Spontanurin) überprüft. Die Analysen zeigten an, dass Tiere mit einer Deletion von Fibronektin dazu tendieren eine Albuminurie zu entwickeln. Ein erhöhter Albuminspiegel weist hierbei auf eine eingeschränkte Filterfunktion der Niere hin. In Patienten mit einer ADPKD stellt der Albumingehalt im Urin einen möglichen Indikator für den Schweregrad der Erkrankung dar (Schrier et al. 2014). Demgegenüber war der Natrium- und Kaliumspiegel im Urin der CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht nennenswert verändert. Eine abweichende Konzentration dieser beiden Salze kann auf eine Niereninsuffizienz hinweisen. Im Großen und Ganzen deuten diese Befunde auf den Beginn einer Nierenschädigung hin. Blutanalysen, Untersuchungen des Urins über 24 h und eine Überprüfung der glomerulären Filtrationsrate ermöglichen jedoch eine genauere Funktionsanalyse.

Ähnlich wie nach einer Deletion von Fibronektin, zeigten Studien in Mausmodellen polyzystischer Nierenerkrankungen, dass das Auftreten bzw. die Ausprägung der Zysten vom Zeitpunkt der Gendeletion abhängt. So führt eine tamoxifen-induzierte Defizienz von Pkd-1 ab dem postnatalen Tag 4 innerhalb von 4 Wochen zu einer

massiven renalen Zystenbildung. Wurde das Gen hingegen erst im adulten Tier deletiert, waren die pathologischen Veränderungen nach einem Monat um ein Vielfaches schwächer ausgeprägt (Lantinga-van Leeuwen et al. 2007). In diesem Zusammenhang spielt ein *entwicklungsspezifischer Switch* am postnatalen Tag 13, welcher eine Änderung in der Genexpression mit sich bringt, eine essentielle Rolle. Eine Inaktivierung des PKD1-Gens vor dem postnatalen Tag 13 geht in diesem Fall mit einer rapiden Zystenbildung einher, während eine Deletion ab dem postnatalen Tag 14 erst nach ca. 5 Monaten zu einer entsprechenden pathologischen Veränderung führt (Piontek et al. 2007).

Ähnliche Beobachtungen konnten auch in Aquaporin-11 defizienten Tieren angestellt werden. Hier hatte eine Tamoxifen-abhängige Induktion der Cre-Rekombinase bis zum postnatalen Tag 8 die Bildung von Zysten zur Folge, wohingegen ein Rekombinationsereignis ab dem postnatalen Tag 12 keine morphologischen Veränderungen mit sich brachte (Rützler et al. 2017). Diese Befunde zeigen eine starke zeitliche Korrelation zu unseren Daten. Dies könnte einerseits darauf hinweisen, dass die Niere in dieser Entwicklungsphase sehr anfällig für etwaige Pathologien ist. Andererseits könnte auch ein direkter Zusammenhang zwischen den einzelnen Genprodukten bestehen. Inoue et al. (2014) belegten diesbezüglich, dass die Bildung der Zysten in Aquaporin-11 defizienten Mäusen mit einer fehlerhaften Glykosylierung von Polycystin-1 im endoplasmatischen Retikulum und einem unzureichenden Membrantransport in Verbindung steht. Ferner konnte in diesen Tieren ein signifikant verlängertes Zilium in den proximalen Tubuli dokumentiert werden. Viele Proteine, deren Genexpression bei der polyzystischen Nierenerkrankung verändert ist, sind auf den primären Zilien lokalisiert. So bilden Polycystin-1 und -2 einen Rezeptor-Ionenkanal-Komplex, welcher im Falle einer sensomechanischen Aktivierung einen Kalziuminflux in die Epithelzelle bewerkstelligt (Ma et al. 2013; Nauli et al. 2003). Des Weiteren zeigten *in vitro* Studien auf, dass β 1-Integrine (α 3, α 5) ebenfalls im Zilium von Epithelzellen exprimiert werden und Fibronektin dadurch Einfluss auf den intrazellulären Kalziumspiegel nehmen kann (Praetorius et al. 2004). Eine Deletion von Fibronektin könnte diese physiologischen Prozesse beeinträchtigen und so ebenfalls eine Zystenbildung begünstigen.

Um den Hauptsyntheseort des in die extrazelluläre Matrix implementierten Fibronektins genauer analysieren zu können, wäre in weiterführenden Studien der

Einsatz von transgenen Mauslinien hilfreich, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors der Niere exprimieren. Um Fibronectin explizit im Tubulus- und Sammelrohrsystem zu deletieren, könnten z.B. Pax8-rtTA / (tetO)₇-Cre / Fn^{fl/fl} Tiere herangezogen werden, die in Abhängigkeit von Doxycyclin eine zeitgebundene Induktion der Cre-Rekombinase ermöglichen (Traykova-brauch et al. 2008; Perl et al. 2002). Eine Defizienz des Glykoproteins im Interstitium / Mesangium der Niere könnte durch eine Kreuzung der Fn^{fl/fl} Mäuse mit Pdgfr-β-CreER^{T2} Tieren und einer anschließenden Tamoxifen-Behandlung bewerkstelligt werden (Seifert et al. 1998). Oh et al. (1981) wiesen mittels einer intravenösen Injektion von humanem Fibronectin in Mäuse und einer anschließenden immunhistochemischen Analyse nach, dass Plasma-Fibronectin in die renale extrazelluläre Matrix inkludiert wird. Folglich könnte sich auch eine spezifische Deletion dieser Isoform auf die Morphologie der Niere auswirken. In der hier vorliegenden Studie war nach einer Tamoxifen-Applikation das Expressionsniveau von Fibronectin in der Leber von CAGG-Cre-ERTM / Fn^{fl/fl} Tieren ebenfalls signifikant reduziert, was auf eine verminderte Produktion von Plasma-Fibronectin hinweisen könnte. Für die eindeutige Klärung dieses Aspekts ist jedoch eine Überprüfung des Fibronectingehalts im Blut notwendig. Vorangegangene Untersuchungen in Mäusen mit einer Deletion von Fibronectin in den Hepatozyten der Leber – dem Syntheseort des Plasma-Fibronectins – zeigten keine Zystenbildung in der Niere. Allerdings führt eine Deletion des Glykoproteins unter Kontrolle des endogen regulierten Albumin-Promotors erst im Alter von etwa 8-12 Wochen zu einer vollständigen Ausschaltung des Plasma-Fibronectins (Postic & Magnuson 2000; Kowelke 2009). Dies korreliert mit unseren Befunden hinsichtlich der Zystenbildung in Abhängigkeit vom Induktionszeitpunkt. Da eine ubiquitäre Deletion von Fibronectin die Morphologie und Funktion der Niere erheblich einschränkt, muss jedoch bei einer zellgebundenen Deletion des Glykoproteins vermutlich mit entsprechenden Kompensationsmechanismen gerechnet werden.

5. Zusammenfassung

Fibronectin ist ein ubiquitär exprimiertes Glykoprotein und zentraler Bestandteil der fibrillären extrazellulären Matrix (ECM) der trabekulären Abflusswege für das Kammerwasser im vorderen Auge. Der Widerstand in den Abflusswegen ist verantwortlich für die Entstehung des intraokulären Drucks, des entscheidenden Risikofaktors für axonale Degeneration beim Glaukom. Um die Rolle von Fibronectin bei der Aufrechterhaltung des intraokulären Drucks zu untersuchen, wurde Fibronectin konditionell und induziert im gesamten Organismus durch Anwendung des Tamoxifen-induzierbaren Cre / loxP-Systems in Fn^{fl/fl} Mäusen mit geflochtenen Allelen des Fibronektins ab dem postnatalen Tag 1 deletiert. Zusätzlich kamen Fn^{fl/fl} Mäuse zur Anwendung, in denen durch Kreuzung mit Connective Tissue Growth Factor-überexprimierenden Mäusen die Synthese von Fibronectin in den trabekulären Abflusswegen erhöht war. Quantitative ultrastrukturelle Untersuchungen zeigten, dass die Deletion von Fibronectin zu einer ausgeprägten Reduktion an fibrillärer ECM in den trabekulären Abflusswegen führte, wobei zusätzlich zu Fibronectin auch andere fibrilläre Proteine betroffen waren, wie Kollagen I. Die Reduktion führte nicht zu signifikanten Änderungen des intraokulären Drucks was darauf hindeutet, dass die fibrilläre ECM nicht für den trabekulären Abflusswiderstand verantwortlich ist.

Die Deletion von Fibronectin ging zudem mit einer Bildung von renalen Zysten an der Rinden-Markgrenze einher, die bereits wenige Tage nach Behandlung auftraten und zum weitgehenden Verlust des Nierenparenchyms wenige Wochen nach der Geburt führten. Eine Aufweitung des tubulären und vaskulären Systems als Ursache für die Zystenentstehung wurde ausgeschlossen. Stattdessen zeigten Serien von Semidünnschnitten sowie die immunhistochemische Färbung gegen PDGFR- β eine Auflockerung des renalen Interstitiums. Die pathologischen Veränderungen, die in späteren Phasen auch eine Fibrose einschlossen, wurden nur beobachtet bei einer induzierten Fibronektindefizienz während der ersten Lebenswoche (P 1 oder P 5), nicht jedoch zu einem späteren Zeitpunkt (P 10 oder später) was auf eine wichtige Rolle von Fibronectin in den finalen, nachgeburtlichen Phasen der Entwicklung des renalen Interstitiums hindeutet. Inwieweit Fibronectin und seine Signalwege bei zystischen Nierenerkrankungen des erwachsenen Organismus eine Rolle spielen, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

6. Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

- Acott, T.S. & Kelley, M.J., 2008. Extracellular matrix in the trabecular meshwork. *Experimental eye research*, 86(4), pp.543–61..
- Aihara, M., Lindsey, J.D. & Weinreb, R.N., 2003. Ocular Hypertension in Mice with a Targeted Type I Collagen Mutation. *IOVS*, 44(4), pp.1581–1585.
- Akimov, S.S. et al. 2000. Tissue Transglutaminase Is an Integrin-Binding Adhesion Coreceptor for Fibronectin. *Journal of cell biology* 148(4):825
- Andrews, P.M. & Bates, S.B., 1984. Filamentous actin bundles in the kidney. *The Anatomical Record*, 210(1)
- Astrof, S., Crowley, D. & Hynes, R.O., 2007. Multiple cardiovascular defects caused by the absence of alternatively spliced segments of fibronectin. *Dev.Biol.*, 311(1), pp.11–24.
- Aumüller, G. et al., 2007. Anatomie, Duale Reihe, *Thieme-Verlag*, Stuttgart
- Behrends, J.C. et al., 2010. Physiologie, Duale Reihe, *Thieme-Verlag*, Stuttgart
- Bergmann, C. et al., 2004. PKHD1 mutations in autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Human mutation*, 23(5), pp.453–63.
- Boneva S.K. et al. 2016. Cre recombinase expression or topical tamoxifen treatment do not affect retinal structure and function, neuronal vulnerability or glial reactivity in the mouse eye. *Neuroscience* 325, pp.188-201
- Bourne RR, Taylor HR, Flaxman SR, Keeffe J, Leasher J, Naidoo K, Pesudovs K, White RA, Wong TY, Resnikoff S, Jonas JB, Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease S, 2016. Number of People Blind or Visually Impaired by Glaucoma Worldwide and in World Regions 1990 - 2010: A Meta-Analysis. *PloS one* 11:e0162229.
- Braakman, S.T. et al., 2015. Colocalization of Outflow Segmentation and Pores along the inner wall of Schlemm's Canal. *Exp. Eye Res.* 130, pp. 87-96
- Bradley, J.M.B. et al., 1998. Effect of matrix metalloproteinases activity on outflow in perfused human organ culture. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 39(13), pp.2649–2658.
- Calvet, J.P., 1993. Polycystic kidney disease: Primary extracellular matrix abnormality or defective cellular differentiation ?, *Kidney International* 43 (1), pp.101–108.
- Chahoud, I., & Paumgarttem, F.J.R., 2017. Differences between NMRI and DBA/2J mice in the development of somites and susceptibility to methylnitrosourea-induced skeleton anomalies. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 89, pp.635-647.
- Cone, F.E. et al., 2010. Differential susceptibility to experimental glaucoma among 3 mouse strains using bead and viscoelastic injection. *Exp Eye Res.* 91(3), 415–424
- Cone, F.E. et al., 2012. The Effects of Anesthesia, Mouse Strain, and Age on Intraocular Pressure and an Improved Murine Model of Experimental Glaucoma. *Exp. Eye Res.*, 99(1), pp.27–35.

- Courtoy, P.J. et al., 1980. Fibronectin localization in the rat glomerulus. *The Journal of cell biology*, 87(3 Pt 1), pp.691–6.
- Cowley, B.D. et al., 1997. Gender and the effect of gonadal hormones on the progression of inherited polycystic kidney disease in rats. *American Journal of Kidney Diseases*, 29 (2), pp. 265-272
- Davidson, A., 2008. Mouse kidney development. *StemBook*, pp.1–30.
- Dessau, W., 1978. SYNTHESIS AND EXTRACELLULAR DEPOSITION OF FIBRONECTIN IN CHONDROCYTE CULTURES Response to the Removal of Extracellular Cartilage Matrix. *The Journal of cell biology*, 79, pp.342-355
- Dixon, A.J. & Burns J., 1982. Ultrastructural localisation of fibronectin in mouse kidney. *J.Pathology* 138, pp.25-31
- Dixon, A. J. et al., 1980. Distribution of fibronectin in normal and diseased human kidneys. *Journal of Clinical Pathology*, 33(11), pp.1021–1028.
- Doughty, M.J. & Zaman M.L., 2000. Human Corneal Thickness and Its Impact on Intraocular Pressure Measures: A Review and Meta-analysis Approach. *Survey of Ophthalmology* 44(5), pp. 367-408
- Duffield, J.S., 2014. Review series Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 124(6), pp.2299–2306.
- Ethier C.R., 2002. The inner wall of Schlemm's Canal. *Exp.Eye Res.* 74, pp. 161-172.
- Ethier, C.R., Coloma, F.M., Sit, A.J., Johnson, M., 1998. Two pore types in the inner-wall endothelium of Schlemm's canal. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, pp. 2041–2048.
- Ethier, C.R., Kamm, R.D., Palaszewski B.A., Johnson, M.C., Richardson, T.M., 1986. Calculations of flow resistance in the juxtacanalicular meshwork. *IOVS* 27 (12), pp. 1741-1750.
- Faller, A. & Schünke M., 2012. Der Körper des Menschen, *Thieme-Verlag*, Stuttgart, 16.Auflage
- Farkouh, A., Frigo, P. & Czejka, M., 2016. Systemic side effects of eye drops : a pharmacokinetic perspective. *Clinical Ophthalmology* (10), pp.2433–2441.
- Faralli, J.A. et al. 2009. Functional Properties of Fibronectin in the Trabecular Meshwork. *Exp. Eye Res.* 88(4), pp. 689-693.
- Filla, M.S., Dimeo, K.D., Tong, T., Peters, D.M., 2017. Disruption of fibronectin matrix affects type IV collagen, fibrillin and laminin deposition into extracellular matrix of human trabecular meshwork (HTM) cells. *Exp. Eye Res.* 165, pp. 7-19
- Fischer, E. et al., 2006. Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease. *Nature Genetics*, 38(1), pp.21–23.
- Fuchshofer, R. & Tamm, E.R., 2012. The role of TGF- β in the pathogenesis of primary open-angle glaucoma. *Cell and Tissue Research*, 347(1), pp.279–290.
- Fukuda, T. et al., 2002. Mice Lacking the EDB Segment of Fibronectin Develop Normally but Exhibit Reduced Cell Growth and Fibronectin Matrix Assembly in Vitro. *Cancer Research* 62 , pp.5603–5610.
- Furness, P.N., 1996. Extracellular matrix and the kidney. *J. Clin. Pathol.*, 49, pp.355–359.
- George, E.L. et al., 1993. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development*, 119(4), pp.1079–91.

- Georg Thieme Verlag, 2015. Pflegepädagogik, I care Pflege. Niere und Harnwege.
- Gong, H., Trinkaus-Randall, V., Freddo, T.F., 1989. Ultrastructural immunocytochemical localization of elastin in normal human trabecular meshwork. *Curr. Eye Res.* 8, 1071–1082.
- Gong, X. et al., 2018. Expression of ILK in Renal Stroma Is Essential for Multiple Aspects of Renal Development. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 315(2), pp. F374-F385.
- Gottanka, J., Johnson, D.H., Martus, P., Lütjen-Drecoll, E., 1997. Severity of optic nerve damage in eyes with POAG is correlated with changes in the trabecular meshwork. *J. Glaucoma* 6, 123–132.
- Grantham, J.J., Geiser, J.L. & Evan, A.P., 1987. Cyst formation and growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney International*, 31(5), pp.1145–1152.
- Graumann W. & Sasse D., 2004. Anatomie, CompactLehrbuch, Band 3 Innere Organsysteme, Schattauer-Verlag, pp.207-209.
- Han, CL., et al., 2008. A Multiplexed Quantitative Strategy for Membrane Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* 7.10, pp.1983-1997.
- Hann, C.R. et al., 2001. Ultrastructural localization of collagen IV, fibronectin, and laminin in the trabecular meshwork of normal and glaucomatous eyes. *Ophthalmic Research*, 33(6), pp.314–324.
- Harris, P.C. & Torres, V.E., 2009. Polycystic Kidney Disease. *Ann Rev Med*, (60), pp.321–337.
- Hartman, H., Lai, H. & Patterson, L., 2007. Cessation of Renal Morphogenesis in Mice. *Developmental biology*, 310(2), pp.379–387.
- Hayashi, S. & McMahon, A.P., 2002. Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: A tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Developmental Biology*, 244(2), pp.305–318.
- Hildebrandt, F. & Otto, E., 2000. Molecular Genetics of Nephronophthisis and Medullary Cystic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 11, pp.1753–1761.
- Hynes, R.O., 1990. Fibronectins. *Springer Verlag*, New York
- Inoue, Y. et al., 2014. Aberrant Glycosylation and Localization of Polycystin-1 Cause Polycystic Kidney in an AQP11 Knockout Model. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25 (12).
- Ishimoto, Y. et al., 2017. Mitochondrial Abnormality Facilitates Cyst Formation in Autosomal Dominant. *Molecular and Cellular Biology*, 37(24), pp.1–23.
- Jaffe, E.A. & Mosher, D.F., 1978. Synthesis of fibronectin by cultured human endothelial cells. *The Journal of experimental medicine*, 147(6), pp.1779–1791.
- Jiang, S.-T., Chuang, W.-J. & Tang, M.-J., 2000. Role of fibronectin deposition in branching morphogenesis of Madin-Darby canine kidney cells. *Kidney International*, 57(5), pp.1860–1867.
- Johansson, S. et al., 1997. FIBRONECTIN-INTEGRIN INTERACTIONS. *Frontiers in Bioscience* 2.
- Johansson, S. et al., 1979. In vitro biosynthesis of cold insoluble globulin (fibronectin) by mouse peritoneal macrophages. *FEBS Letters*, 105(2), pp.313–316.
- Johnson, M. et al., 1992. Modulation of outflow resistance by the pores of the inner wall endothelium. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 33(5), pp.1670–1675.

- Johnson, M., 2006. "What controls aqueous humour outflow resistance?". *Experimental eye research*, 82(4), pp.545–57.
- Johnstone, M.A., Grant, W.G., 1973. Pressure-dependent changes in structures of the aqueous outflow system of human and monkey eyes. *Am. J. Ophthalmol.* 75, 365–383.
- Junglas, B. et al., 2012. Connective tissue growth factor causes glaucoma by modifying the actin cytoskeleton of the trabecular meshwork. *The American journal of pathology*, 180(6), pp.2386–403.
- Kass MA, Heuer DK, Higginbotham EJ, Johnson CA, Keltner JL, Miller JP, Parrish RK, 2nd, Wilson MR, Gordon MO, 2002. The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 120:701-713; discussion 829-730.
- Kawelke, N., 2009. Die Rolle von Fibronektin in der Leber und im Knochen.
- Keller, K.E. et al., 2008. Effects of Modifiers of Glycosaminoglycan Biosynthesis on Outflow Facility in Perfusion Culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49(6), pp.2495–2505.
- Kielty, C.M. et al., 2002. Fibrillin : from microfibril assembly to biomechanical function. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.B* , 357, pp.207–217.
- Kleinman, H.K. et al. 1981. Interaction of fibronectin with collagen fibrils. *Biochemistry* 20(8), pp. 2325-2330
- Kohno, T. et al., 1987. Immunofluorescent studies of fibronectin and laminin in the human eye. *Investigative ophthalmology & visual science*, 28(3), pp.506–14.
- Kos, C.H., 2004. Cre / loxP System for Generating Tissue-specific Knockout Mouse Models. *Nutrition Reviews*, 62 (6) , pp.243–246.
- Kölln C. & Reichl S., 2016. Cytochrome P450 Activity in Ex Vivo Cornea Models and a Human Cornea Construct. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(7), pp. 2204-2212.
- Kular, J.K., Basu, S. & Sharma, R.I., 2014. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering*, 5, pp. 1-17
- Kurkinen, M. & Alitalo, K., 1979. Fibronectin and Procollagen produced by a clonal line of Schwann cells. *FEBS LFTTCRS* Volume 102, number 1
- Kwon, Y.H. et al., 2009. Primary open-angle glaucoma. *The New England journal of medicine*, 360(11), pp.1113–24.
- Lantinga-van leeuwen, I.S. et al., 2007. Kidney-specific inactivation of the Pkd1 gene induces rapid cyst formation in developing kidneys and a slow onset of disease in adult mice. *Human Molecular Genetics*, 16(24), pp.3188–3196.
- Last JA, Pan T, Ding Y et al., 2011. Elastic modulus determination of normal and glaucomatous human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:2147–2152
- Lee, K. et al., 2015. Inactivation of integrin-β1 prevents the development of polycystic kidney disease after the loss of polycystin-1. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(4), pp.888–95.
- Leiss, M. et al., 2008. The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Current opinion in cell biology*, 20(5), pp.502–7.

- Lelongt, B. & Ronco, P., 2003. Role of extracellular matrix in kidney development and repair. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 18(8), pp.731–42.
- Lemley, K. V. & Kriz, W., 1991. Anatomy of the renal interstitium. *Kidney International*, 39(3), pp.370–381.
- Leske MC, Heijl A, Hussein M, Bengtsson B, Hyman L, Komaroff E., 2003. Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: the early manifest glaucoma trial. *Arch Ophthalmol* 121:48-56.
- Liao, YF. et al., 2002. The EIIIA Segment of Fibronectin is a Ligand for Integrins $\alpha_9\beta_1$ and $\alpha_4\beta_1$ providing a novel mechanism for regulating cell adhesion by alternative splicing. *The Journal of biological chemistry*, 277(17), pp.14467-14474.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-408.
- Lüllmann-Rauch, R., 2012. Taschenlehrbuch Histologie, *Thieme-Verlag*
- Lütjen-Drecoll, E., 1973. Structural factors influencing outflow facility and its changeability under drugs. A study in *Macaca arctoides*. *Investigative Ophthalmology* 12 (4).
- Ma, M., Tian, X. & Igrashi, P., 2013. Loss of cilia suppresses cyst growth in genetic models of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat.Genet.* 45(9), pp.1004–1012.
- Makogonenko, E. et al., 2002. Interaction of Fibrin(ogen) with Fibronectin: Further Characterization and Localization of the Fibronectin-Binding Site. *Biochemistry* 41 (25), pp. 7907-7913
- Manabe, R. et al., 1997. Modulation of Cell-adhesive Activity of Fibronectin by the Alternatively Spliced EDA Segment. *The Journal of Cell Biology* , 139(1), pp.295–307.
- Mao, Y. & Schwarzbauer, J.E., 2005. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 24(6), pp.389–99.
- Marshall, G.E., Konstas, A.G., Lee, W.R., 1991. Immunogold ultrastructural localization of collagens in the aged human outflow system. *Ophthalmology*, 98, 692–700
- Mason, R.M. & Wahab, N.A., 2003. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(5), pp.1358–1373.
- Mcdonald, J.A., Kelley, D.G. & Broekelmann, T.J., 1982. Role of Fibronectin in Collagen Deposition : Fab ' to the Gelatin-binding Domain of Fibronectin Inhibits Both Fibronectin and Collagen Organization in Fibroblast Extracellular Matrix. *Journal of cell biology* 92, pp. 485-492
- Mosher, D.F. & Furcht, L.T., 1981. Fibronectin: Review of its Structure and Possible Functions. *Journal of Investigative Dermatology*, 77(2), pp.175–180.
- Murcia, N.S., Sweeney, W.E. & Avner, E.D., 1999. New insights into the molecular pathophysiology of polycystic kidney disease. *Kidney International*, 55(4), pp.1187–1197.
- Muro, A.F. et al., 2003. Regulated splicing of the fibronectin EDA exon is essential for proper skin wound healing and normal lifespan. *Journal of Cell biology* , 162(1), pp.149–160.
- Muzumdar M.D. et al., 2007. A global double-fluorescent Cre Reporter Mouse. *Genesis* 45, pp. 593-605

- Nauli, S.M. et al., 2003. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *nature genetics*, 33, pp.129–137.
- Nayfield, S.G. & Gorin, M.B., 1996. Tamoxifen-associated eye disease. A review. *Journal of Clinical Oncology*, 14(3)
- Ng, Y.Y. et al., 1998. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney International*, 54(3), pp.864–876.
- Nicosia, R.F. et al., 1993. Fibronectin promotes the elongation of microvessels during angiogenesis in vitro. *Journal of cellular physiology* 154(3), pp.654–661
- Nie, X. & Arend, L.J., 2017. Deletion of Pkd1 in renal stromal cells causes defects in the renal stromal compartment and progressive cystogenesis in the kidney. *Laboratory Investigation*, 97(12), pp.1427–1438.
- Nilsson, S.F.E., 1997. The uveoscleral outflow routes. *Eye*, 11(2), pp.149–154.
- Nishio, S. et al., 2010. Loss of Oriented Cell Division Does not Initiate Cyst Formation. *Journal of the American Society of Nephrology*, 21 (2), pp. 295–302.
- Norman, J., 2011. Fibrosis and progression of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812, pp.1327–1336.
- Oh, E., Pierschbacher, M. & Ruoslahti, E., 1981. Deposition of plasma fibronectin in tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(5), pp.3218–3221.
- Overby, D.R., Stamer, W.D. & Johnson, M., 2010. The Changing Paradigm of Outflow Resistance Generation: Towards Synergistic Models of the JCT and Inner Wall Endothelium. *Ophthalmology*, 88(4), pp.656–670.
- Paganini-Hill, A. & Clark, L.J., 2000. Eye problems in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Breast Cancer Research and Treatment*, 60 (2), pp.167–172
- Pattabiraman, P.P. & Rao, P.V., 2010. Mechanistic basis of Rho GTPase-induced extracellular matrix synthesis in trabecular meshwork cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 298 (3), pp.C749–C763
- Perl, A.T. et al., 2002. Early restriction of peripheral and proximal cell lineages during formation of the lung. *PNAS*, 99 (16), pp. 10482–10487.
- Piontek, K. et al., 2007. A critical developmental switch defines the kinetics of kidney cyst formation after loss of Pkd1. *Nature medicine*, 13(12), pp.1490–1495.
- Postic, C. & Magnuson, M.A., 2000. DNA excision in liver by an albumin-Cre transgene occurs progressively with age. *Genesis*, 26(2), pp.149–150.
- Praetorius, H. a et al., 2004. Beta1-integrins in the primary cilium of MDCK cells potentiate fibronectin-induced Ca²⁺ signaling. *American journal of physiology. Renal physiology*, 287(5), pp.F969–78.
- Prozialeck, W.C., Lamar, P.C. & Appelt, D.M., 2004. Differential expression of E-cadherin, N-cadherin and beta-catenin in proximal and distal segments of the rat nephron. *BMC Physiology*, 4 (10).
- Quigley HA, 2011. Glaucoma. *Lancet* 377:1367–1377
- Rehnberg, M., Ammitzboll, T. & Tengroth, B., 1987. Collagen distribution in the lamina cribrosa and

- the trabecular meshwork of the human eye. *British Journal of Ophthalmology*, 71, pp.886–892.
- Reid T, Kenney C, Waring GO, 1982. Isolation and characterization of fibronectin from bovine aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22, pp. 57–61.
- Rohen, J.W., Futa, R. & Lütjen-drecoll, E., 1981. The fine structure of the cribriform meshwork in normal and glaucomatous eyes as seen in tangential sections. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 21, pp.574–585.
- Romberger, J., 1997. Molecules in focus. *Int .J. Biochem. Cell Biol.*, 29, pp.939–943.
- Rützler, X.M. et al., 2017. Temporal deletion of Aqp11 in mice is linked to the severity of cyst-like disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 312, pp.343–351.
- Sabatier, L. et al., 2009. Fibrillin Assembly requires Fibronectin. *Molecular biology of the cell*, 20, pp. 846–858.
- Saito, T. et al., 2017. Proteomic analysis of AQP11-null kidney: Proximal tubular type polycystic kidney disease. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 13, pp.17–21.
- Santas, A. J. et al., 2003. Effect of Heparin II Domain of Fibronectin on Aqueous Outflow in Cultured Anterior Segments of Human Eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(11), pp.4796–4804.
- Savinova, O.V. et al., 2001. Intraocular pressure in genetically distinct mice: an update and strain survey. *BMC Genetics* 2,12
- Schieren, G. et al., 1996. Murine models of polycystic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 11, pp.38–45.
- Schlecht, A. et al., 2015. Tamoxifen-Containing Eye Drops Successfully Trigger Cre-Mediated Recombination in the Entire Eye. *Retinal Degenerative Diseases*, pp.495–500
- Schrier, R.W. et al., 2014. Predictors of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Progression. *J Am Soc Nephrol*, 25, pp.1–20.
- Schwarzbauer, J.E., 1991. Identification of the fibronectin sequences required for assembly of a fibrillar matrix. *The Journal of cell biology*, 113(6), pp.1463–73.
- Seifert, R.A., Alpers, C.E. & Bowen-Pope, D.F., 1998. Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in the developing and adult mouse kidney. *Kidney International*, 54(3), pp.731–746.
- Si, H. et al., 2009. Human and murine kidneys show gender- And species-specific gene expression differences in response to injury. *PLoS ONE*, 4(3).
- Silverthorn D.U., 2009. Physiologie. *Pearson Studium*, 4.Auflage
- Smith, H.S., Riggs, J.L. & Mosesson, M.W., 1979. Production of Fibronectin by Human Epithelial Cells in Culture. *Cancer research*, 39, pp.4138–4144.
- Smith, R.S., Zabaleta, A., Savinova, O. V & Wm, S., 2001. The mouse anterior chamber angle and trabecular meshwork develop without cell death. *BMC Developmental Biology*, 1:3
- Sottile, J. et al., 2007. Fibronectin-dependent collagen I deposition modulates the cell response to fibronectin. *Am J Physiol Cell Physiol*, 293, pp.1934–1946.

- Sottile, J. & Hocking, D.C., 2002. Fibronectin Polymerization Regulates the Composition and Stability of Extracellular Matrix Fibrils and Cell-Matrix Adhesions. *Molecular Biology of the Cell*, 13, pp.3546–3559.
- Sottile, J. & Mosher, D.F., 1997. N-terminal type I modules required for fibronectin binding to fibroblasts and to fibronectin's III1 module. *The Biochemical journal*, 323 (Pt 1, pp.51–60.
- Sramek S.J. et al., 1987. Fibronectin distribution in the rat eye. An immunohistochemical study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 28, pp. 500-505
- Swaminathan, S.S. et al., 2014. Aqueous outflow: segmental and distal flow. *Journal of cataract and refractive surgery*, 40(8), pp.1263–72.
- Takahashi, S. et al., 2007. The RGD motif in fibronectin is essential for development but dispensable for fibril assembly. *The Journal of cell biology*, 178(1), pp.167-178.
- Tamkun, J.W. & Hynes, R.O., 1983. Plasma fibronectin is synthesized and secreted by hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 258(7), pp.4641–4647.
- Tamm, E.R., 2013. Functional morphology of the outflow pathways of aqueous humor and their changes in open angle glaucoma. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*, 110(11), pp.1026–35.
- Tamm, E.R., 2009. The trabecular meshwork outflow pathways: structural and functional aspects. *Experimental eye research*, 88(4), pp.648–55.
- Tamm, E.R. & Fuchshofer, R., 2007. What increases outflow resistance in primary open-angle glaucoma? *Survey of ophthalmology*, 52, 2(6), pp.S101-4.
- Tamm, E.R. & Ohlmann, A., 2012. Entwicklung des menschlichen Auges. *Der Ophthalmologe* 109(9), pp. 911-928.
- Tektas, OY & Lütjen-Drecoll E., 2009. Structural changes of the trabecular meshwork in different kinds of glaucoma. *Exp. Eye Res.* 88, pp. 769-775
- To, W.S. & Midwood, K.S., 2011. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 4(1), p.21.
- Traykova-brauch, M. et al., 2008. An efficient and versatile system for acute and chronic modulation of renal tubular function in transgenic mice. *Nat Med.*, 14(9), pp.979–984.
- Ueda, J., Wentz-hunter, K. & Yue, B.Y.J.T., 2001. Distribution of Myocilin and Extracellular Matrix Components in the Juxtacanalicular Tissue of Human Eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43 (4), pp.1068–1076.
- Umihira, J. et al., 1994. Localization of Elastin in the Normal and Glaucomatous Human Trabecular Meshwork. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 35(2), pp.486–494.
- Valli, M., Tira, M.E. & Balduini, C., 1982. Isolation and Characterization of 2-Proteoglycans from Bovine Tendon. *Italian Journal of Biochemistry*, 31(3), pp.183–197.
- VanderWyst, S.S. et al., 2011. Structural basement membrane components and corresponding integrins in Schlemm's canal endothelia. *Molecular vision*, 17, pp.199–209.
- Velling, T. et al., 2002. Polymerization of Type I and III Collagens is dependent on Fibronectin and enhanced by Integrins $\alpha_{11}\beta_1$ and $\alpha_2\beta_1$. *The Journal of biological chemistry*, 277(40), pp.37377-37381.

- Vranka, J. a et al., 2015. Extracellular matrix in the trabecular meshwork: intraocular pressure regulation and dysregulation in glaucoma. *Experimental eye research*, 133, pp.112–25.
- Wang, J., Zohar. R., McCulloch, C.A., 2006. Multiple roles of α -smooth muscle actin in mechanotransduction. *Exp. Cell Res.* 312, pp.205-214
- Wang, Y. et al., 2014. Plasma fibronectin supports hemostasis and regulates thrombosis. *Journal of Clinical Investigation* 124(10), pp.4281–4293.
- Wang, Z. et al., 2010. RGD-independent Cell Adhesion via a Tissue Transglutaminase-Fibronectin Matrix Promotes Fibronectin Fibril Deposition and Requires Syndecan-4/2 and $\alpha 5 \beta 1$ Integrin Co-signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 285, pp. 40212-40229
- Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA, 2014. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. *The journal of the American Medical Association* 311, pp. 1901-1911.
- Welge-Lüssen, U. et al., 2000. Induction of Tissue Transglutaminase in the Trabecular Meshwork by TGF- $\beta 1$ and TGF- $\beta 2$. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, pp. 2229-2238
- White, E.S. & Muro, A.F., 2011. Fibronectin splice variants: Understanding their multiple roles in health and disease using engineered mouse models. *IUBMB Life*, 63(7), pp.538–546.
- Wiederholdt, M. et al. 2000. The regulation of trabecular meshwork and ciliary muscle contractility. *Progress in Retinal and Eye Research* 19(3) pp. 271-295
- Wierzbicka-Patynowski, I., 2003. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *Journal of Cell Science*, 116(16), pp.3269–3276.
- Williams, E.C. et al., 1982. Conformational States of Fibronectin. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 257(24), pp.14973–14978.
- Wilson P.D., 2004. Polycystic kidney disease. *The New England Journal of Medicine*, 350, pp.151-164
- Wu, B., Sahoo, D. & Brooks, J.D., 2013. Comprehensive gene expression changes associated with mouse postnatal kidney development. *The Journal of urology*, 189(6), pp.2385–90.
- Wu, C. et al., 1998. Integrin-linked Protein Kinase Regulates Fibronectin Matrix Assembly , E-cadherin Expression , and Tumorigenicity . *The Journal of Biological Chemistry*, 273(1), pp.528–536.
- Yamada, K.M. et al., 1980. Characterization of fibronectin interactions with glycosaminoglycans and identification of active proteolytic fragments. *Journal of Biological Chemistry*, 255(13), pp.6055–6063.
- Ye, P. et al., 2004. Fibronectin induces ureteric bud cells branching and cellular cord and tubule formation. *Kidney international*, 66, pp.1356–1364.
- Zeisberg, M. & Kalluri, R., 2015. Physiology of the Renal Interstitium. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 10(10), pp.1831-1840

6.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro (10^{-6})
IIICS	type III connecting segment
α-SMA	alpha-smooth muscle-actin
A	Ampere
AC	anterior chamber (Vorderkammer)
ADH	antidiuretisches Hormon
<i>ad libitum</i>	nach Belieben
ADPKD	autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung
AP	alkalische Phosphatase
ARPKD	autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD31	Cluster of Differentiation 31
cDNA	complementary DNA
cFn	cellular Fibronectin (zelluläres Fibronectin)
CM	ciliary muscle (Ziliarmuskel)
C _t	cycle threshold
CTGF	connective tissue growth factor
CTM	corneoscleral trabecular meshwork (korneosklerales Trabekelwerk)
Cu ^{1+/2+}	Kupfer
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
d.h.	das heißt
dH ₂ O	destilliertes Wasser

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EC	Endothelzelle
ECM	extracellular matrix (extrazelluläre Matrix)
EDA / EDB	extra domain A/B
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	et alia (und andere)
F-Aktin	filamentöses Aktin
Fn	Fibronektin
fwd	forward
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
GNB2L	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like
h	Stunden
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
ILK	integrin-linked kinase
<i>in vitro</i>	außerhalb des lebenden Organismus
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
IOD	intraokulärer Druck
JCT	juxtacanalicular tissue (juxtakanalikuläres Gewebe)
kDa	kilo-Dalton
l	Liter
LC	Flüssigchromatographie
m	milli- (10^{-3}), Meter

M	Molar (mol/l)
MCKD	medullär-zystische Nierenerkrankung
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
mT / mG	membrane-targeted tandem dimer tomato / membrane-targeted green fluorescent protein
n	Anzahl der Versuchstiere
NaCl	Natrium-Chlorid-Lösung
NPH	Nephronophthise
o.g.	oben genannt
P 4/8	postnataler Tag 4/8
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDGFR-β	beta-type platelet-derived growth factor receptor
PFA	Paraformaldehyd
pFn	plasmatisches Fibronektin
PhP	Phosphatpuffer
POWG	primäres Offenwinkelglaukom
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
s	Sekunden
SC	Schlemm-Kanal
SDS	Natriumduodecylsulfat

SD-Plaques	sheath-derived Plaques
SEM	standard error of the mean (Standardfehler d. Mittelwerts)
sog.	sogenannte/s
SS	Skleralsporn
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBS	Tris-buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
tdTomato	tandem dimer Tomato
TEMED	N,N,N`N`-Tetramethylethylendiamin
TGF- β 2	transforming growth factor β 2
TM	trabecular meshwork (Trabekelwerk)
TX	Tamoxifen
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
UTM	uveal trabecular meshwork (uveales Trabekelwerk)
V	Volt
v.a.	vor allem
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
x	-mal, -fach
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil, teilweise

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Primärstruktur eines Fibronektin Monomers mit Bindungsstellen für Interaktionspartner und Spleiß-Varianten	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Kammerwasserflusses im Auge	11
Abbildung 3: Meridionalschnitt durch das Trabekelwerk.....	13
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Kammerwasserabflusses gemäß der „Funneling“-Hypothese	14
Abbildung 5: Aufbau der Niere.....	18
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Nephrons	20
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Lokalisation der loxP-Stellen im Fibronektin Gen	33
Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines Semidry-Blot.....	47
Abbildung 9: Expression von tdTomato und EGFP im Kammerwinkel von CAGG-Cre-ER TM / mT/mG Tieren nach Applikation von Tamoxifen mittels Augentropfen.....	59
Abbildung 10: Expression von tdTomato und EGFP in der Niere von CAGG-Cre-ER TM / mT/mG Tieren nach Applikation von Tamoxifen mittels Augentropfen.....	60
Abbildung 11: Expression von tdTomato und EGFP in der Leber von CAGG-Cre-ER TM / mT/mG Tieren nach Applikation von Tamoxifen mittels Augentropfen.....	60
Abbildung 12: Reduktion von Fn und seiner mRNA im Trabekelwerk nach Tamoxifen-induzierter Deletion in CAGG-Cre-ER TM / Fn ^{fl/fl} Tieren.....	62
Abbildung 13: Semidünnschnitte des Kammerwinkels und der Schlemm-Kanal Region in Kontroll- und CAGG-Cre-ER TM / Fn ^{fl/fl} Tieren nach Tamoxifen Induktion .	64
Abbildung 14: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Sagittalschnitten der juxtakanalikulären Region in Fn ^{fl/fl} und CAGG-Cre-ER TM / Fn ^{fl/fl} Tieren	65
Abbildung 15: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Tangentialschnitten der juxtakanalikulären Region in Fn ^{fl/fl} und CAGG-Cre-ER TM / Fn ^{fl/fl} Tieren	66
Abbildung 16: Optically empty spaces in der juxtakanalikulären Region von Kontroll- und CAGG-Cre-ER TM / Fn ^{fl/fl} Tieren	67
Abbildung 17: Relatives mRNA-Expressionslevel von Kollagen I, IV, Elastin, Fibrillin-1 und Integrin-β1 in CAGG-Cre-ER TM / Fn ^{fl/fl} Tieren	68
Abbildung 18: Immunhistochemische Färbung gegen α-SMA an sagittalen Schnitten in Fn ^{fl/fl} und CAGG-Cre-ER TM / Fn ^{fl/fl} Tieren	69
Abbildung 19: Applanationstonometrische Messung des intraokulären Drucks in Fn ^{fl/fl} und CAGG-Cre-ER TM / Fn ^{fl/fl} Mäusen.....	70

Abbildung 20: Die linsenspezifische Überexpression von CTGF führt langfristig zu einem Sehnervenschaden	72
Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung gegen α -SMA im Kammerwinkel von $F_n^{fl/fl}$ und $\beta B1-CTGF / F_n^{fl/fl}$ Mäusen	73
Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung gegen Fibronectin im Kammerwinkel von $F_n^{fl/fl}$ und $\beta B1-CTGF / F_n^{fl/fl}$ Tieren	74
Abbildung 23: Reduktion des Fn Proteingehalts im Kammerwinkel von $\beta B1-CTGF / CAGG-Cre-ER^{TM} / F_n^{fl/fl}$ Tieren nach Tamoxifen-induzierter Deletion.....	75
Abbildung 24: Eine Deletion von Fibronectin in $\beta B1-CTGF$ Tieren hat keinen signifikanten Einfluss auf die Sehnervschädigung und den intraokulären Druck	77
Abbildung 25: Immunhistochemische Färbung gegen α -SMA im Kammerwinkel von $\beta B1-CTGF / F_n^{fl/fl}$ und $\beta B1-CTGF / CAGG-Cre-ER^{TM} / F_n^{fl/fl}$ Mäusen.....	79
Abbildung 26: Makroskopische Aufnahme und HE-Färbung der Nieren von $F_n^{fl/fl}$ und $CAGG-Cre-ER^{TM} / F_n^{fl/fl}$ Tieren nach 5-tägiger Behandlung mit Tamoxifen-Augentropfen	80
Abbildung 27: Signifikante Reduktion von renalem Fn und seiner mRNA in $CAGG-Cre-ER^{TM} / F_n^{fl/fl}$ Tieren nach Tamoxifen-induzierter Deletion	82
Abbildung 28: HE-Färbung von Lunge, Leber, Gl.submandibularis, Milz und Thymus von $F_n^{fl/fl}$ und $CAGG-Cre-ER^{TM} / F_n^{fl/fl}$ Tieren nach 5-tägiger Behandlung mit Tamoxifen-Augentropfen	84
Abbildung 29: Reduktion von Fn und seiner mRNA in der Leber von $CAGG-Cre-ER^{TM} / F_n^{fl/fl}$ Tieren nach Tamoxifen-induzierter Deletion.....	86
Abbildung 30: Progressiver Verlauf der renalen Zystenbildung nach Tamoxifen-induzierter Deletion von Fn.....	87
Abbildung 31: Signifikante Reduktion der mRNA und moderat verringertes renales Fn in $CAGG-Cre-ER^{TM} / F_n^{fl/fl}$ Tieren an P 4 nach Tamoxifen-induzierter Deletion.....	89
Abbildung 32: Signifikante Reduktion von Fibronectin und seiner mRNA in der Niere von $CAGG-Cre-ER^{TM} / F_n^{fl/fl}$ Tieren nach Tamoxifen-induzierter Deletion (P 8)	90
Abbildung 33: Semidünnschnitte zystischer Nieren nach Tamoxifen-induzierter Deletion von Fn	92
Abbildung 34: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Zystenbegrenzung	93
Abbildung 35: Zysten resultieren nicht aus einer Erweiterung von Blutgefäßen	95
Abbildung 36: Zysten entstehen nicht aufgrund einer Aufweitung distaler Tubuli.....	95
Abbildung 37: Zysten resultieren nicht aus einer Weitung proximaler Tubuli.....	96

Abbildung 38: Zysten entstehen nicht aufgrund einer Aufweitung des Sammelrohrsystems	96
Abbildung 39: Renale Zysten entstehen aufgrund einer Auflockerung von interstitiellem Gewebe	97
Abbildung 40: Zellen renaler Zysten zeigen keine E-Cadherin spezifische Zell-Zell- Verknüpfung	99
Abbildung 41: Zellen renaler Zysten zeigen keine Basallamina-spezifische Präsenz von Kollagen IV	100
Abbildung 42: Zellen renaler Zysten zeigen keine Basallamina-spezifische Präsenz von Laminin	101
Abbildung 43: Zunehmende Akkumulation von Kollagen ringsum die Zysten	103
Abbildung 44: Immunhistochemische Färbung gegen α -SMA.....	105
Abbildung 45: Zunehmende Akkumulation von F-Aktin ringsum die Zyste	107
Abbildung 46: Semidünnschnitt einer zystischen Niere nach Tamoxifen-induzierter Deletion von Fn (P 4).....	108
Abbildung 47: Semidünn-Serienschnitte einer renalen Zyste an P 4.....	109
Abbildung 48: Semidünnschnitt einer zystischen Niere nach Tamoxifen-induzierter Deletion von Fn (P 14).....	110
Abbildung 49: Semidünn-Serienschnitte einer renalen Zyste an P 14.....	111
Abbildung 50: Gesteigerte Proteinexpression ausgewählter Komponenten und Faktoren nach einer Deletion von Fibronectin	113
Abbildung 51: Verringerte Proteinexpression ausgewählter Komponenten und Faktoren nach einer Deletion von Fibronectin	114
Abbildung 52: Relativer Albumin-, Natrium- und Kalium-Spiegel im Urin von Fn ^{fl/fl} und CAGG-Cre-ER TM / Fn ^{fl/fl} Mäusen.....	115
Abbildung 53: Eine Deletion von Fn ab P 5 resultiert ebenfalls in der Bildung von renalen Zysten.....	117
Abbildung 54: Eine ubiquitäre Deletion von Fn ab P 10 führt zu keiner Bildung von renalen Zysten.....	119
Abbildung 55: Die Deletion von Fn nach Abschluss der renalen Entwicklung führt zu keiner Zystenbildung in der Niere	121

6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Materialien und Geräte	25
Tabelle 2: Übersicht über die eingesetzten Verbrauchsmaterialien	26
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Reagenzien	26
Tabelle 4: Liste der eingesetzten Enzymkits.....	28
Tabelle 5: Genotypisierungsprimer	28
Tabelle 6: Auflistung der für die quantitative real-time RT-PCR verwendeten Primer	29
Tabelle 7: Übersicht über die für Western Blot Analysen und Immunohistochemie eingesetzten Antikörper	29
Tabelle 8: Zusammensetzung der verwendeten Gele	30
Tabelle 9: Rezepte für eingesetzte Lösungen und Puffer	30
Tabelle 10: Mastermix der Genotypisierungs-PCR für FN ^{fl/fl}	37
Tabelle 11: PCR-Programm für die Genotypisierungs-PCR für FN ^{fl/fl}	37
Tabelle 12: Mastermix der Genotypisierungs-PCR für die Cre-Rekombinase	38
Tabelle 13: PCR-Programm für die Genotypisierungs-PCR der Cre-Rekombinase .	38
Tabelle 14: Mastermix der Genotypisierungs-PCR für mT/mG.....	38
Tabelle 15: PCR-Programm für die Genotypisierungs-PCR für mT/mG	39
Tabelle 16: Mastermix der Genotypisierungs-PCR für β B1	39
Tabelle 17: PCR-Programm für die Genotypisierungs-PCR von β B1	39
Tabelle 18: Mastermix der Genotypisierungs-PCR für SV40.....	40
Tabelle 19: PCR-Programm für die Genotypisierungs-PCR von SV40	40
Tabelle 20: Reaktionsansatz zur Synthese von cDNA	43
Tabelle 21: PCR-Programm zur Synthese von cDNA	43
Tabelle 22: Mastermix-cDNA-Ansatz (1x) für die quantitative real-time RT-PCR	44
Tabelle 23: Primermix-Ansatz (1x) für die quantitative real-time RT-PCR.....	44
Tabelle 24: Programm für die quantitative real-time RT-PCR.....	44
Tabelle 25: Kurzprotokolle für Fn und GAPDH Western-Blots.....	48
Tabelle 26: Einbettschema für Paraffin-Schnitte.....	49
Tabelle 27: Einbettschema für Epon-Schnitte.....	50
Tabelle 28: Kurzprotokolle zu den immunohistochemischen Färbungen.....	54

6.5 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof Dr. Ernst Tamm für die Möglichkeit, meine Promotion am Lehrstuhl für Humananatomie und Embryologie zu absolvieren, die interessante Fragestellung, sowie die Übernahme des Erstgutachtens. Darüber hinaus möchte ich mich für das Vertrauen bedanken, welches er mir stets entgegengebracht hat.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Fässler danke ich für die Bereitstellung der Fn^{fl/fl} Tiere.

Bei Herrn Prof. Dr. Frank Schweda bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie des Mentoriats meiner Promotion. Außerdem möchte ich mich für seine umfassende Unterstützung im Rahmen des Nierenprojekts bedanken.

Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz und Prof. Dr. Peter Oefner, sowie Prof.Dr. Wolfram Gronwald danke ich ebenfalls für Ihre Unterstützung und Zusammenarbeit bezüglich des Nierenprojektes.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Rudolf Fuchshofer für die Bereitstellung der transgenen Tiere und die Zusammenarbeit bezüglich des β B1-CTGF Projekts.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei Margit Schimmel, Elke Stauber, Angelika Pach und Silvia Babl für die umfassende Hilfe bei histologischen und molekularbiologischen Analysen bedanken.

Danke auch an Dr. Leonie Herrnberger, Dr. Anja Schlecht, Dr. Andrea Dillinger, Dr. Lena Schneider, Sabrina Schmitt, Franziska Scherl und Christina Bielmeier für die lockere Atmosphäre und allgemeine Hilfsbereitschaft im Labor! Weiterhin danke ich Dr. Anna Federlein, Frieda Webinger, Katharina Ortmaier, Dr. Katharina Gerl und Dr. Katharina Limm für ihre Kooperation.

Vielen Dank auch an meinen Mann und meine Familie, die mich in den letzten Jahren immer unterstützt haben.

7. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe.

Regensburg, den 15. Mai 2019

Silke Seibold